

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
1 juillet 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/055210 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68,
G01N 33/569, C12Q 1/70

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003675

(22) Date de dépôt international :
11 décembre 2003 (11.12.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/15718 12 décembre 2002 (12.12.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : UNI-
VERSITÉ JOSEPH FOURIER [FR/FR]; 621 Avenue
Centrale, F-38041 Grenoble Cedex 9 (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : BAL-
AKIREVA, Larissa [FR/FR]; 7 Rue des Beaux Tailleurs,
F-38000 Grenoble (FR).

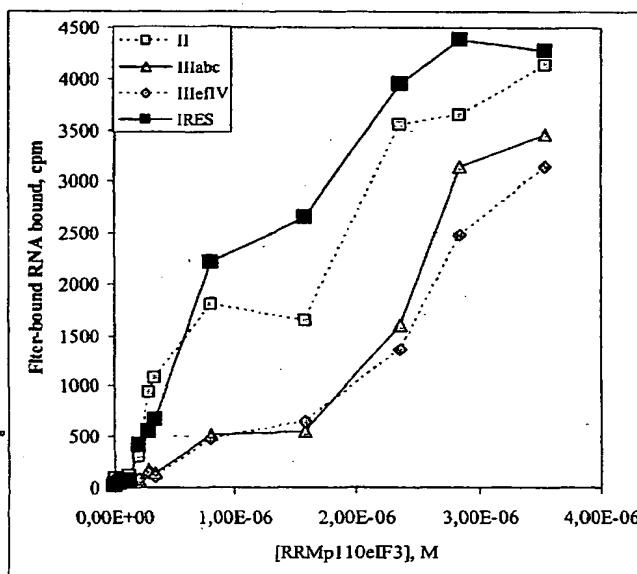
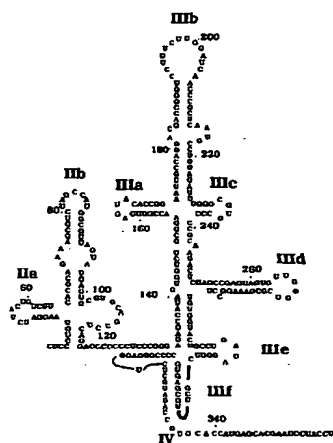
(74) Mandataires : VUILLERMOZ, Bruno etc.; Cabinet
Laurent & Charras, 20 Rue Louis Chirpaz, BP 32, F-69131
Ecully (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: MOLECULES INHIBITING HEPATITIS C VIRUS PROTEIN SYNTHESIS AND METHOD FOR SCREENING
SAME

(54) Titre : MOLECULES INHIBITRICES DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE C ET PROCÉDE DE
CRIBLAGE DESDITES MOLECULES INHIBITRICES



(57) Abstract: The invention concerns a method for screening molecules which consists, in vitro: a) in incubating together the subunit p116 (SEQ ID4) of the eIF3 protein, the nucleotide sequence of region II (SEQ ID2) of the HCV IRES or any sequence containing at least 10 successive nucleotides of the region II (SEQ ID2) of the HCV IRES and the molecule to be tested; b) in detecting the possible formation of p116/IRES region II complex, the absence of complex indicating the inhibiting capacity of the tested molecule, to inhibit the formation of said complexes; c) in selecting the molecules inhibiting the formation of complexes.

[Suite sur la page suivante]



(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) **Abrégé :** L'invention concerne un procédé de criblage de molécules selon lequel, in vitro :a/ on incube ensemble la sous unité p116 (SEQ ID4) de la protéine eIF3, la séquence nucléotidique de la région II (SEQ ID2) de l'IRES de VHC ou toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2) de l'IRES de VHC et la molécule à tester,b/ on détecte ensuite la formation éventuelle de complexe p116 / région II IRES, l'absence de complexe témoignant de la capacité inhibitrice de la molécule testée, à inhiber la formation desdits complexes,c/ on sélectionne les molécules inhibant la formation des complexes.

MOLECULES INHIBITRICES DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE C ET PROCÉDE DE CRIBLAGE DES DITES MOLECULES INHIBITRICES

5

L'invention se rapporte au traitement de pathologies virales ou non virales dans lesquelles sont impliquées des protéines, dont la synthèse est initiée par le biais d'un site d'entrée interne des ribosomes (IRES), dont au moins une partie de la séquence est similaire d'un IRES à l'autre. Parmi ces pathologies figurent notamment mais de façon non limitative, parmi les pathologies virales, les virus appartenant à la famille des Flaviridae tels que le virus de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV), et parmi les pathologies non virales, les cancers dans lesquels sont impliquées certaines protéines, telles que par exemple les facteurs de croissance fibroblastiques responsables de la néovascularisation des tumeurs en développement, le proto-oncogène c-myc etc....

10

15

Plus précisément, le traitement proposé dans l'invention consiste à empêcher la fixation du facteur d'initiation de la traduction, eIF3, sur l'ARN constitutif de la partie 5' non codante de la séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) des génomes viraux ou de certains gènes impliqués dans les pathologies précitées, de sorte à inhiber la synthèse protéique. En conséquence, l'invention a également pour objet un procédé de criblage de molécules aptes à inhiber la formation du complexe : séquence de l'IRES / eIF3, en particulier les nucléotides 56 à 92 du domaine II de l'IRES et le polypeptide recombinant correspondant à la partie centrale (acides aminés 185 à 279) de la sous-unité protéique p116 (également dénommée p110, eIF3b, eIF-3eta (BLAST P55884)) de eIF3.

20

25

Le processus de recherche et développement de nouvelles molécules thérapeutiques «Drug Discovery» nécessite avant tout l'identification de nouvelles cibles associées aux maladies (protéine, ARN ou ADN, ou leur complexe) et leur validation. La cible identifiée et validée est ensuite utilisée dans des tests de criblage de molécules, qui permettent de sélectionner des molécules actives. C'est cette approche qui est proposée par le Demandeur, la cible étant constituée par une séquence spécifique de l'IRES de VHC (domaine II) et un polypeptide recombinant dérivé de la séquence de la sous-unité p116 de eIF3.

30

35

Dans la suite de la description, l'invention est plus particulièrement décrite en rapport avec le traitement du virus du VHC bien que celle-ci s'applique également au virus de la peste porcine (CSFV) ou celui de la diarrhée bovine (BVDV), et ce, compte tenu de la forte homologie existant entre ces virus appartenant à la même famille.

5

Le virus de l'hépatite C a été identifié comme étant responsable de l'hépatite non A non B développée fréquemment au cours de pathologies chroniques malignes, du type par exemple cirrhose du foie ou encore carcinome hépato-cellulaire. Le VHC est transmis par transfusion sanguine ou de dérivés sanguins. Le génome du VHC se présente sous forme d'ARN simple brin d'une taille avoisinant les 9,4 kb et codant pour une polyprotéine

10

unique constituée de 3 010 acides aminés (CHOO et al., 1989).
Contrairement au schéma classique, l'initiation de la traduction de l'ARN messenger de VHC ne se fait pas par reconnaissance de la coiffe (ou CAP), puisque celle-ci est absente (traduction dite "cap-dépendante"), mais par le biais d'un site d'entrée interne des ribosomes (IRES), positionné au niveau de la région 5' non traduite (5'-UTR) du VHC, entre les nucléotides 40 et 372 de la séquence du VHC (traduction dite "cap-indépendante") (équivalente à SEQ ID1 selon l'invention). Le mécanisme de synthèse des protéines virales étant très différent de celui de la cellule-hôte, une stratégie possible de développement de nouvelles molécules thérapeutiques consiste à inhiber la synthèse protéique virale sans influence aucune sur la synthèse protéique de la cellule hôte. De plus, la séquence de l'IRES étant une région très conservée chez ce virus réputé très variable (92% d'homologie), on peut s'attendre à ce que l'utilisation de cette séquence comme cible, soit particulièrement intéressante.

15

20

25

Différentes études de structures ont montré que l'IRES du VHC était replié sur lui-même pour former trois domaines ou régions, en boucle, respectivement les régions II (IIa, IIb), III (IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe, IIIf) et IV tels que représentées sur la figure 1 (ZHAO et al, 2001), l'IRES comprenant en outre un codon start AUG. L'ARN simple brin du CSFV et du BVDV contient également une séquence IRES contenant un codon start AUG, la structure de l'IRES étant similaire à celle du VHC (figure 1). En outre, l'alignement des séquences constitué du génome de ces trois virus montre une forte homologie de la région II de l'IRES, notamment du site MRR (RNA recognition motif), ce qui tend à laisser penser que les molécules agissant sur l'IRES du VHC pourraient également agir sur celui du CSFV ou du BVDV.

30

35

En pratique, l'initiation de la traduction de l'ARNm débute par la reconnaissance et la fixation par l'IRES de la sous-unité ribosomique 40S et de facteurs d'initiation, en particulier, le facteur d'initiation dénommé "eIF3".

Le facteur d'initiation eIF3 est un complexe multiprotéique constitué de 10 sous-unités différentes telles que par exemple p36, p44, p47, p66, p110, p116 et p170. Les études de prédiction de structure secondaire ont montré que la sous-unité p116 présentait dans sa partie centrale, située entre les acides aminés 185 et 279, un motif de reconnaissance de l'ARN (MRR) β - α - β - β - α - β . La localisation du motif de reconnaissance de la sous-unité p116 de eIF3 est représentée sur la figure 2. De la même façon, la partie C-terminale de la sous-unité p44 présente, elle aussi, une structure similaire β - α - β - β - α - β , correspondant à un MRR hypothétique. Ce type de motif est retrouvé dans un grand nombre de protéines se liant à l'ARN (RNA binding protein), telles que par exemples les protéines hnRNP ou encore snRNP, mais également dans quelques protéines se liant à de l'ADN simple brin. D'après les algorithmes de prédiction de structure secondaire, la partie centrale de la sous-unité p116 est repliée selon une conformation similaire à celle des MRR connus pour les acides aminés conservés IVVD et TK/RGF/YVE localisés dans des feuilles 1 et 3 correspondants aux motifs de reconnaissance RNP-2 et RNP-1 (voir figure 2). Bien que de par sa structure secondaire et son homologie, le MRR de p116 de eIF3 réponde aux critères des "putative RNA-binding proteins", sa réelle capacité à fixer l'ARN n'a jamais été mise en évidence auparavant.

En effet, le document FR-A-2 815 358 décrit une méthode de traitement de l'hépatite C consistant à empêcher la synthèse protéique du VHC par inhibition supposée de la fixation de la sous-unité p116 de eIF3 sur la région III de l'IRES. Les molécules candidates à cette inhibition correspondent à des polypeptides présentant une affinité avec la région III de l'IRES supérieure à celle de la sous-unité p116 de eIF3. En pratique, les inhibiteurs polypeptidiques sont obtenus par criblage de protéines p116 mutées avec la séquence IRES de VHC. Plus précisément, seule la partie centrale correspondant au motif de reconnaissance (MRR) est mutée, le polypeptidique étant susceptible de se fixer sur la boucle IIIb de l'IRES de VHC avec une affinité supérieure ou égale à celle du MRR non muté de p116. En pratique, les mutations sont introduites dans le MRR par mutagenèse aléatoire ou par mutagenèse ciblée selon la technique de phage display. Là encore, aucune indication n'est donnée concernant la séquence nucléotidique de la région III de l'IRES susceptible d'interagir avec le MRR muté. En outre, aucun résultat d'une éventuelle inhibition n'est donné dans les exemples.

Sizova et al, 1998, ont montré que eIF3 protégeait la région apicale IIIb de l'IRES du VHC et du CSFV, en particulier les nucléotides 204, 212, 214, 215 et 220 (voir Figure 1, nucléotides marqués ②), du clivage enzymatique ou de modifications chimiques. Plus récemment, Kieft et al, 2001, en utilisant les mêmes méthodes que celles mises en œuvre par SIZOVA précité, ont identifié les nucléotides de la tige IIIa, boucle IIIb et tige IIIb comme étant les éléments principaux de l'interaction (voir Figure 1, nucléotides marqués ③). De plus, en utilisant la technique dite «filter-binding assay », ces différents auteurs ont montré que la délétion de la région apicale IIIb entraînait une diminution de l'interaction eIF3-IRES d'au moins 10-fois. Ainsi, la boucle apicale IIIb est actuellement considérée comme étant le site le plus probable de fixation de eIF3. Toutefois, aucun de ces documents ne montre de manière précise l'existence d'une interaction entre le domaine IIIb isolé et eIF3. De même, aucun d'entre eux n'identifie une séquence d'ARN spécifique se liant à eIF3.

Buratti et al, 1998, a montré que les protéines p170 et 116/p110 de eIF3 se liaient à la région III de l'IRES de VHC sans toutefois, là encore, identifier la séquence d'ARN de l'IRES envisagée.

Le document WO 01/44266 rapporte également l'interaction entre la sous-unité p116 du facteur d'initiation eIF3 et la région III de l'IRES de VHC, plus précisément au niveau d'un domaine capable de s'apparier et définissant deux séquences nucléotidiques de 7 bases et 9 bases, respectivement. La définition de ce motif minimal permet de mettre en œuvre un test pour identifier des composés capables d'entrer en compétition dans la formation du complexe eIF3-VHC.

Par ailleurs, le document US-A-6 001 990 décrit une série d'oligonucléotides, sélectionnés pour leur capacité à inhiber la traduction de l'ARN de VHC. Parmi eux, l'oligonucléotide de 28 nucléotides de séquence TAGACGCTTTCTGCGTG AAGACAGTAGT, correspondant à la séquence SEQ ID 3 de ce document, s'hybride effectivement avec la région II de l'IRES de VHC.

On sait que les ARN-binding protéines de la famille MRR reconnaissent des séquences courtes simple brin (<10 nt) appartenant à une boucle dans des structures d'ARN de type boucle-tige ou à une extension de tige. Ces fragments courts intégrés dans un contexte structural approprié sont essentiels à la fixation spécifique des MRR aux ARN messagers

ou pré-messagers comprenant 1000 nucléotides ou plus. Par conséquent, il est important d'identifier la séquence minimale de l'ARN de l'IRES interagissant avec le MRR. En effet, l'identification de cette séquence minimum permet tout d'abord de comprendre le mécanisme de l'interaction, mais aussi de concevoir des oligonucléotides antisens complémentaires (de taille comprise généralement entre 30-35nt) susceptibles d'inhiber la formation du complexe ARN/protéine ou dans le cas d'ARNi (ARN d'interférence ou silencing de taille comprise entre 21-23 nt) de cibler la région d'interaction. L'identification de la séquence minimale est également essentielle pour effectuer les études structurales nécessaires pour le criblage *in silico* ainsi que pour l'optimisation de molécules actives. Selon une technique connue de l'homme du métier, on recherche la structure atomique du complexe ARN/protéine ou ARN seul en 3 dimensions par RMN. On sait que cette technique ne peut être utilisée que pour des fragments d'ARN seul ou complexé, de faible taille (inférieure à 25 nt). Une seconde technique correspond à la cristallographie aux rayons X, technique qui peut être appliquée aux fragments d'ARN de plus grande taille limitée toutefois à 70nt. Au contraire, la cristallographie des protéines n'est pas limitée par la taille mais ne peut cependant n'être appliquée que sur des protéines isolées et non sur des complexes multiprotéiques, tels que eIF3 (délétion).

En d'autres termes, l'un des problèmes que se propose de résoudre l'invention est d'identifier précisément la plus petite séquence d'ARN de l'IRES se liant au MRR de p116, de sorte à pouvoir utiliser cette séquence dans des méthodes de criblage de molécules d'intérêt (délétion).

Au cours de sa recherche, le Demandeur a non seulement découvert que la sous-unité p116 de eIF3 ne se fixait pas sur la région III mais sur la région II de l'IRES de VHC (SEQ 2 selon l'invention), mais également réussi à identifier précisément la séquence nucléotidique de l'IRES, dénommée par la suite séquence consensus (SEQ 3 selon l'invention), interagissant avec le MRR de p116.

Par ailleurs, la fonctionnalité du MRR (SEQ 5 selon l'invention) prédit dans la sous-unité p116 de eIF3 (SEQ 4 selon l'invention) a été démontrée par le Demandeur. Ainsi, l'expression de cette partie centrale de la sous-unité p116 de eIF3 sous forme recombinante et la mise en évidence de sa fixation spécifique au domaine II de l'IRES de VHC permet d'utiliser ce polypeptide à la place du complexe multiprotéique eIF3, nécessitant une purification à partir de lysat de cellules en culture ou de réticulocytes.

Ceci permet d'une part de rendre le criblage beaucoup moins onéreux mais surtout d'appliquer des méthodes de biologie structurale, telles que la RMN ou la cristallographie, pour résoudre la structure atomique de ce complexe ARN-protéine et pour concevoir des inhibiteurs.

5

Compte tenu de l'homologie existant entre la séquence IRES de VHC et celles du CSFV et du BVDV, la découverte de la séquence consensus permet d'envisager de traiter les différentes pathologies dans lesquels ces virus sont impliqués, grâce à des molécules aptes à bloquer la synthèse protéique par inhibition de la fixation de la sous-unité protéique p116 de eIF3, en particulier de son MRR, sur la région II de ces virus.

10

Les molécules candidates peuvent être des molécules existantes ou futures dont les propriétés inhibitrices sont testées par criblage.

15 En conséquence, l'invention concerne tout d'abord un procédé de criblage de molécules selon lequel, in vitro :

- a/ on incube ensemble la sous unité p116 (SEQ ID4) de la protéine eIF3, la séquence nucléotidique de la région II (SEQ ID2) de l'IRES de VHC ou toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2) de l'IRES de VHC et la molécule à tester,
- 20 b/ on détecte ensuite la formation éventuelle de complexe p116 / région II IRES, l'absence de complexe témoignant de la capacité inhibitrice de la molécule testée, à inhiber la formation desdits complexes,
- c/ on sélectionne les molécules inhibant la formation des complexes.

25

Par molécule, on désigne toute molécule chimique d'origine synthétique ou naturelle, connue ou future. Ce terme désigne également des complexes multiprotéiques comme des anticorps, des protéines, des peptides, des ribonucléotides ou des désoxyribonucléotides naturels ou modifiés, et des molécules PNA (peptides-nucleic acids).

30

Comme déjà dit, la sous unité p116 de eIF3 contient un motif de reconnaissance de l'ARN (MRR) situé dans la partie centrale, plus spécifiquement entre les acides aminés 175 et 279 de la séquence SEQ ID4. La séquence d'acides aminés du MRR de p116 correspond à la séquence SEQ ID5.

35

En d'autres termes et dans un mode de réalisation avantageux du procédé de criblage de l'invention, seule la séquence du motif de reconnaissance de la protéine p116 (SEQ ID5) est incubée. Le polypeptide MRR de p116 (SEQ ID5) est préférentiellement produit sous forme recombinante, en association avec un tag facilitant sa purification. Il peut être
5 marqué, lors de la préparation, à l'aide d'acides aminés radioactifs, biotinylés ou fluorescents, permettant de détecter la formation du complexe protéine/ARN.

Par ailleurs et comme il sera démontré dans les exemples, le Demandeur a identifié précisément la séquence de la région II de l'IRES du VHC se liant au motif de reconnaissance de la protéine p116. Cette séquence, dénommée dans la suite de la
10 description "séquence consensus" (SEQ ID3), contient 37 nucléotides situés entre les nucléotides 56 et 92 de la séquence IRES du VHC. Cette séquence peut être produite par synthèse chimique ou par transcription in vitro, et marquée par radioactivité, biotinylation ou fluorescence.

15

En conséquence et dans un mode de réalisation préféré, seule une partie de la région II est incubée et correspond à la séquence nucléotidique consensus SEQ ID3 ou une séquence comprenant au moins 8nt successifs de la séquence SEQ ID 3.

20

L'ARN étant une molécule instable, la molécule d'ARN à incubé selon l'invention peut être modifiée en vue d'augmenter sa stabilité. Dans ce but, elle peut contenir des squelettes phosphorothioates, méthylphosphonates, phosphoramidates, acétamidates, carbamates, ...etc. Elle peut également contenir des bases modifiées, telles que des 2'-désoxynucléosides, 2'-O-alcylnucléosides, 2'-fluoro-2'-désoxynucléosides.

25

En pratique, l'incubation est effectuée dans une solution tampon à température ambiante. Avantagusement, des concentrations croissantes de molécules à tester sont incubées afin de détecter une efficacité éventuellement dose dépendante.

30

La seconde étape du procédé consiste à détecter la formation de complexe protéine / ARN. Toute méthode de détection connue de l'homme du métier peut être mise en œuvre. Si de l'ARN radiomarké est utilisé, le mélange ARN/protéine/molécule est avantagusement filtré au travers d'une membrane de nitrocellulose, puis la détection se fait par mesure de la radioactivité liée à la membrane, correspondant à la quantité d'ARN

35

fixée sur la protéine. Alternativement, l'ARN peut être marqué non radioactivement (par

exemple avec de la biotine), incubé avec la protéine, filtré au travers d'une membrane de nitrocellulose et révélé à l'aide de streptavidine ou d'anticorps spécifiques.

D'autres techniques peuvent être utilisées pour détecter l'interaction ARN/protéine, telles que
5 SPA (Scintillation Proximity Assay), FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), HTRF (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence), LANCE (Lanthanide Chelation Excitation), FP (Fluorescence Polarization), FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), FL (Fluorescence Lifetime Measurements).

10 Dans l'approche SPA, le polypeptide MRR de p116 purifié est immobilisé à l'aide d'anticorps spécifiques de l'épitope *myc*, présent dans la partie C-terminale du polypeptide, ou des chélateurs de Ni^{2+} , sur une plaque 96 puits imprégnée de scintillant. L'ARN consensus radiomarké est ajouté. Un signal n'est détecté que si l'ARN est fixé sur le polypeptide immobilisé.

15

Comme il sera décrit dans les exemples (Figure 8), cette technique de criblage a été utilisée par le Demandeur pour étudier et comparer la capacité de 15 aminoglycosides différents à dissocier le complexe MRR de p116/ARN consensus.

20 Dans un mode de réalisation avantageux, les résultats du criblage selon l'invention sont corrélés avec ceux de tests supplémentaires consistant à tester, ex vivo, l'influence de la molécule sélectionnée sur la traduction cap-indépendante (dépendante de l'IRES) et la traduction cap-dépendante à l'aide d'une construction bi-cistronique.

25 Cette étape peut être mise en œuvre par toute méthode connue de l'homme du métier, en particulier par la construction de vecteurs bicistroniques constitués de deux luciférase encadrant la séquence de la région II (SEQ ID 2) ou toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2), ou la séquence consensus (SEQ ID 3) ou une séquence flanquante comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la
30 séquence SEQ ID 3 ; la première luciférase étant traduite de manière cap-dépendante et la seconde de manière cap-indépendante ou inversement. Des cellules sont ensuite transfectées par les vecteurs bicistroniques puis le taux de traduction par Dual Luciférase est mesuré. Les cellules susceptibles d'être transfectées sont choisies de manière classique par l'homme du métier, telles que par exemples les cellule HeLa ou encore Huh 7.

35

La comparaison des résultats obtenus avec le test de criblage proposé par le Demandeur et ceux des tests bi-cistroniques permet de ne retenir que les molécules aptes à la fois à empêcher la fixation de p116 sur le domaine II de l'IRES in vitro et à inhiber spécifiquement la traduction IRES-dépendante dans un modèle cellulaire (ex vivo). De plus, comme le montre l'exemple 4, le fait que la tobramycine soit à la fois capable de dissocier in vitro le complexe p116/II à toutes les concentrations testées et soit l'inhibiteur le plus spécifique de la traduction contrôlée par l'IRES démontre la validité et la pertinence du choix du complexe p116/IRES comme cible de criblage.

- 10 En conséquence, l'invention concerne également l'utilisation des molécules identifiées à l'issue du procédé de criblage précédemment décrit pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).
- 15 Plus largement, toute molécule apte à inhiber in vitro la fixation de la protéine p116, en particulier son motif de reconnaissance (MRR) sur la région II ou une séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2), notamment une partie de la région II correspondant à la séquence SEQ ID3 ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3, peut être utilisée pour la fabrication d'un
- 20 médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

Dans le cadre d'un premier essai mettant en œuvre le procédé de criblage de l'invention, le Demandeur a constaté que les aminoglycosides, en particulier la tobramycine, étaient aptes à inhiber la fixation du MRR de p116 sur la séquence consensus de la région II de l'IRES et qu'en outre, cette inhibition n'affectait pas la traduction cap-dépendante.

En conséquence, l'invention concerne également l'utilisation d'aminoglycosides, en particulier de la tobramycine, pour la fabrication d'une composition destinée au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

Il peut également s'agir de dérivés des aminoglycosides, en particulier des dérivés de la tobramycine, possédant des propriétés améliorées dans le contexte pharmaceutique. Ces aminoglycosides, préférentiellement la tobramycine, ou leurs dérivés peuvent être administrés en association avec des liposomes en vue d'une meilleure absorption.

5

En particulier, l'aminogroupe en position 6' dans la tobramycine est particulièrement exposé et peut être sélectivement acétylé puis utilisé pour greffer d'autres groupements. L'invention concerne donc également l'utilisation des analogues de la tobramycine, particulièrement ceux modifiés en position amino 6', pour le traitement de l'hépatite C.

10

Par ailleurs, la découverte de la séquence consensus rend possible l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3, à l'exception de la séquence TAGACGCTTTCTGCGTGAAGACAGTAGT, comme médicament, en particulier pour le traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV). Dans le même sens, des ARNi contenant 19 nucléotides de la séquence SEQ ID 3 (séquence consensus) flanqués par UU peuvent être utilisés comme médicament pour le traitement des mêmes pathologies que ci-avant.

15

20

Dans un premier mode de réalisation, l'invention a donc également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3, à l'exception de la séquence TAGACGCTTTCTGCGTGAAGACAGTAGT.

25

Comme déjà dit, les molécules testées dans le procédé de criblage peuvent être des molécules connues telles que par exemple les aminoglycosides mais également des molécules restant à développer.

30

Dans ce dernier cas, il apparaît possible, d'identifier in silico, à partir d'une bibliothèque de molécules, des molécules capables d'inhiber la synthèse protéique des virus appartenant à la famille de Flaviridae.

35

En conséquence, l'invention concerne également un procédé de criblage d'une bibliothèque de molécules in silico consistant :

- à déterminer les coordonnées atomiques soit de la région II de l'IRES (SEQ ID 2) du VHC ou de toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2) de l'IRES de VHC, soit de la séquence se liant spécifiquement au MRR de la protéine P116 de eIF3 (SEQ ID 3) ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3, soit du complexe de la région II (SEQ ID 2) ou de la séquence spécifique (SEQ ID 3) avec le motif de reconnaissance de la protéine p116 de eIF3 (SEQ ID 5)
- puis à cribler la bibliothèque de molécules chimiques avec les coordonnées atomiques ainsi déterminées.

Tout logiciel connu de l'homme du métier pourra être utilisé pour la détermination des coordonnées atomiques.

Les molécules ainsi identifiées pourront alors être testées dans le procédé décrit précédemment consistant à détecter in vitro des complexes ARN/protéine.

L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront mieux de l'exemple de réalisation suivant à l'appui des figures annexées.

La figure 1 est une représentation de la structure de l'IRES de VHC. Celui-ci est constitué de 3 domaines en boucle, II (IIa, IIb), III (IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe, IIIf) et IV. Les références ② et ③ indiquent les nucléotides impliqués dans la fixation de eIF3 d'après les références Sizova *et al.* (1998) et Kieft *et al.* (2001), respectivement.

La figure 2 montre la localisation du Motif de Reconnaissance de l'ARN dans la sous-unité p116 de eIF3 et la prédiction de sa structure secondaire.

La Figure 3 compare l'affinité du MRR de p116 pour les régions II, IIIabc, IIIefIV et la totalité de l'IRES de VHC, mesurée après rétention sur nitrocellulose. A gauche, une représentation graphique de l'IRES du VHC permet de localiser les différents fragments testés.

La figure 4 est un schéma montrant le principe du procédé de production de sous-fragments aléatoires de l'IRES de VHC.

La figure 5 est un schéma montrant le principe du procédé de sélection des sous-fragments aléatoires spécifiques du MRR de p116 de eIF3 obtenus selon le schéma de la figure 4 (5A), et les séquences des matrices de transcription et des amorces utilisées (5B).

La Figure 6 représente les résultats d'alignement des séquences d'ARN, sélectionnées à la fin des 4^{ème} et 5^{ème} cycle de sélection/amplification (6A), et la localisation de la séquence «consensus» (orientation sens) dans l'IRES du VHC (6B).

La figure 7A montre la capacité de la séquence consensus (DOR4-35 et DOR5-4) à inhiber l'interaction entre IRES et MRR de p116, par rapport à celle de l'IRES, II, IIabc, IIIefIV et ARN de transfert.

La figure 7B montre que la séquence consensus (nt 56-92) présente une affinité pour le MRR-p116 de eIF3 supérieure à celle du fragment IIIa (nt 153-173) et à celle de la partie apicale du fragment II (nt 73-92).

La figure 8 représente la capacité des aminoglycosides à inhiber la fixation du MRR d'eIF3 sur la séquence consensus de la région II de l'IRES de VHC.

La figure 9 représente l'effet des aminoglycosides sur la traduction cap-dépendante et cap-indépendante en culture cellulaire. La construction bicistronique dont le schéma de clonage est représenté à la figure 9A est utilisée pour la transfection transitoire de cellules HeLa avec 1 µg d'ADN plasmidique (Figure 9B) et 2,5 µg d'ADNp (Figure 9C).

Exemple 1 : Mise en évidence de la capacité du motif de reconnaissance (MRR) de p116 à se fixer sur la région II de l'IRES de VHC

1/ Clonage et expression du motif de reconnaissance de p116 de eIF3

La séquence d'acides aminés du motif de reconnaissance (MRR) de la protéine p116 correspond à la séquence SEQ ID5 située entre les acides aminés 175 et 279 de la séquence SEQ ID4 (correspondant à la séquence de la protéine p116). L'ADNc codant pour le MRR est amplifié par RT-PCR à partir d'ADN extrait de cellules HeLa en présence des amorces suivantes :

- SEQ ID6 : CATATGGATCGGCCCCAGGAAGCAGATGGAATC
- SEQ ID7 : GTGCTCGAGCCACTCGTCACTGATCGTCATATA

Le fragment amplifié est cloné dans un plasmide pET-30b (Novagen) en fusion avec His₆-Tag C-terminal entre les sites *Nde* et *Xho*. La protéine est ensuite produite dans *E. Coli* (souche BL21lysS) puis purifiée sur Ni²⁺ - NTA agarose dans des conditions natives.

2/ Synthèse de l'IRES total et ses fragments IIIabc, IIIefIV et Iiab

a/ Principe

On synthétise et on clone 4 séquences nucléotidiques différentes, respectivement :

- 5 - une séquence nucléotidique correspondant à la totalité de l'IRES située entre les nucléotides 40 et 372 de l'ADN de VHC (b),
- une séquence nucléotidique correspondant à la région IIIabc, située entre les nucléotides 141 et 252 de l'ADN de VHC ©,
- une séquence nucléotidique correspondant à la région IIIefIV située entre les
10 nucléotides 250 et 372 de l'ADN de VHC (d),
- une séquence nucléotidique correspondant à la région Iiab située entre les nucléotides 40 et 119 de l'ADN de VHC (e).

b/ Clonage de la totalité de la séquence nucléotidique de l'IRES (SEQ ID1)

- 15 L'ADNc de l'IRES (SEQ ID1) est amplifié par RT-PCR à partir d'ARN total isolé de patients atteints du VHC (génotype 1b) en présence des amorces nucléotidiques suivantes :

SEQ ID8 : ACCGCTAGCCTCCCCTGTGAGGAACTACT

SEQ ID9 : GAAAGCTTTTTTCTTTGAGGTTTAGGATTTGTGCTCATGATG

20 CACG

Le fragment amplifié est d'abord cloné dans un plasmide pGEM-T puis ensuite dans pSP-luc+ (Promega) entre des sites *NheI* et *Hind III*. Le plasmide pSP-IRES-luc+ ainsi obtenu contient l'IRES du VHC cloné en fusion avec la luciférase sous contrôle du promoteur SP6.

25 Une fois séquencée (GenomeExpress, Grenoble), la séquence de l'IRES a été alignée et comparée aux autres séquences d'IRES déposées dans les banques (telles que D49374 ou AF139594). L'identité observée était de 96,6% ce qui correspond au taux moyen de variabilité génomique des IRES entre différentes souches du VHC.

30

c/ Synthèse de la région IIIabc

La synthèse de l'ADNc de la région IIIabc est effectuée de la manière suivante. Deux oligonucléotides chevauchant, dont le premier, SEQ ID10, est constitué du promoteur de la T7 polymérase et de la séquence nucléotidique de la région IIIa et IIIb (Nt 139-215 de
35 l'ARN de VHC) et le second, SEQ ID11, de la séquence nucléotidique de la région IIIb et

IIIc (Nt 193-252 de l'ARN de VHC) sont hybridés en présence d'un fragment de Klenow. Les oligonucléotides ont les séquences suivantes :

- SEQ ID10 : TAATACGACTCACTATAGGGTAGTGGTCTGCGGAACCGGT
GAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATAAACCCGCT
5 CAA

- SEQ ID11 : TAGCAGTCTCGCGGGGGGCACGCCCAAATCTCCAGGCATTG
AGCGGGTTGATCCAAGAAAG

Le fragment d'ADNc double brins obtenu est ensuite amplifié par PCR en présence de T7
10 correspondant à la SEQ ID 12 : TAATACGACTCACTATAGGG.

Et d'un oligonucléotide flanquant dont la séquence est la suivante :

SEQ ID13 : TAGCAGTCTCGCGGGGGGCACG.

d/ Synthèse de la région IIIefIV

15 L'ADNc correspondant à la région IIIefIV (Nt 250-372) a été obtenu par amplification
PCR du plasmide pSP-ΔIRES-luc+ à l'aide des amorces dont les séquences
nucléotidiques correspondent à celles de SP6 (SEQ ID14 :
TATTTAGGTGACACTATAGAAT) et SEQ ID13. Le plasmide pSP-ΔIRES-luc+ résulte
de la digestion du plasmide pSP-IRES-luc+ par NheI, les sites de coupure étant situés
20 entre les nucléotides 39/40 et 248/249 de l'IRES. Le produit d'amplification SP6 -> SEQ
ID13 est ensuite utilisé comme matrice dans la réaction de transcription in vitro à l'aide
de la SP6-polymerase (SP6 MEGAscript, Ambion).

e/ Synthèse de la région Iiab

25 L'ADNc correspondant à la région Iiab a été obtenu par amplification par PCR du
plasmide pSP-IRES-luc+ à l'aide des amorces SP6 (SEQ ID 14) et SEQ ID 15
GTCCTGGTGGCTGCAGGACACTCATAC. Le produit d'amplification SP6 -> SEQ
ID15 est ensuite utilisé comme matrice dans la réaction de transcription in vitro à l'aide
de la SP6-polymerase.

30

3/ Fixation du MRR de p116 sur l'IRES et ses domaines IIIabc, IIIefIV, Iiab

Des fragments d'ARN radiomarqués sont obtenus par transcription in vitro des matrices
précitées en présence de [α -32P]UTP. Les fragments d'ARN sont purifiés dans un gel à
35 6 % d'acrylamide-urée et précipités. Les culot d'ARN sont repris dans 25mM Tris-HCl,

pH 7,4. Afin de permettre la renaturation, l'ARN a été incubé à 65°C dans le tampon précité pendant 5-7min puis lentement refroidi jusqu'à température ambiante. Les ARN renaturés ont été incubés avec des concentrations croissantes de protéine dans le même tampon 25mM Tris-HCl, pH 7,4, à température ambiante pendant 5 min.

- 5 Le mélange de protéines et d'ARN est ensuite déposé sur une membrane de nitrocellulose préalablement lavée avec le même tampon. La radioactivité du filtre contenant les complexes ARN-protéine a été mesurée à l'aide de compteur de radioactivité MicroBeta Trilux (PerkinElmer).
- 10 Dans l'hypothèse d'une inhibition compétitive, le MRR de p116 a été préalablement incubé avec de l'ARN non radiomarké (concentration : protéine 0,7 μ M, ARN : 0,1 à 1 μ M) pendant 30 min à température ambiante suivi de l'ajout de l'ARN de l'IRES radiomarké. L'analyse de fixation de l'ARN sur la protéine a été effectuée exactement comme décrit ci-dessus.

15

4/ Résultats

- L'affinité des motifs de reconnaissance d'ARN (MRR) de la sous-unité p116 de eIF3 pour l'IRES entier et ses fragments II, IIIabc et IIIefIV a été étudié par rétention sur
- 20 nitrocellulose. Comme il apparaît sur la Figure 3, la protéine fixe l'IRES avec un Kd apparent de 0,8 μ M. Cependant, l'affinité de MRRp116 pour le fragment IIIabc (site putatif de fixation de eIF3) est significativement inférieure à celle pour l'IRES et comparable à celle pour IIIefIV utilisé comme témoin négatif. Cela était inattendu, d'autant que les résultats publiés antérieurement supposaient que la partie apicale de la
- 25 boucle formant la région IIIb était le site probable de fixation de eIF3 (Sizova D, 1998 ; Buratti, 1998 ; Kieft et al, 2001 ; F-A-2 815 358). En réalité et comme montre cette figure, le motif de reconnaissance de eIF3 se trouve non pas sur la région IIIabc mais sur la région II.

Exemple 2 : Identification de la séquence consensus se liant au MRR p116**1/ Production de sous-fragments aléatoires de l'IRES de VHC et procédé de sélection de fragments spécifiques se fixant au MRRp116 de eIF3**

5

La méthode dénommée SERF (Selection of Random Fragments) décrite par STELZ (2000) est utilisée pour synthétiser les séquences aléatoires de l'IRES. Son principe est représenté sur la figure 4.

A/ Production des sous-fragments

2 ug ADNc de l'IRES sont digérés par 5U d'une Dnase I (Rnase-free, Amersham), à température ambiante, pendant 15 minutes, permettant d'obtenir des fragments d'ADNc, dont la taille varie entre 30 et 100 nucléotides. Des bouts francs sont générés à l'extrémité des fragments d'ADNc obtenus, par Taq-polymérase à 72°C, pendant 10 minutes dans un tampon PCR à base de dNTP 1 mMol. La Taq-polymérase ajoute en même temps des résidus supplémentaires « dA » à l'extrémité 3' de fragments (Figure 4). Ceci permet d'augmenter l'efficacité de ligation des fragments obtenus dans le vecteur pGEM-T-Easy (Promega), muni à son tour de « dT » complémentaires à l'extrémité 5' (Figure 4). Les fragments d'ADN sont ensuite clonés en présence de T4 DNA ligase (BioLabs) dans un vecteur pGEM-T Easy (Promega) entre les promoteurs T7 et SP6. Les fragments d'ADN sont ensuite amplifiés en présence des oligonucléotides T7 et SP6 puis le produit d'amplification est utilisé comme matrice pour la transcription par SP6 (MEGAscript, Ambion). Les transcrits de taille supérieure à 200nt correspondant aux transcrits avec l'insert > 60nt ont été purifiés sur gel d'acrylamide 10 % 8M urée (figure 4, M correspondant à des marqueurs ARN « Century markers », Ambion).

B/ Sélection des sous-fragments

La protéine recombinante MRRp116 de eIF3 est purifiée sur colonne Ni-NTA-agarose dans des conditions natives (figure 5). La protéine purifiée est ensuite incubée avec la bibliothèque constituée des fragments d'ARN purifiés obtenus ci-avant dans un tampon 25mM Tris-HCl, pH 7,4 pendant 15 min à température ambiante. La concentration de l'ARN est, au départ égale à 0,2 µM et celle de la protéine, égale à 0,8 µM. Le mélange protéine / ARN est ensuite déposé sur une membrane de nitrocellulose préalablement lavée avec le même tampon. Le filtre contenant les complexes ARN-protéine est ensuite coupé en morceaux et l'ARN est extrait avec une solution SDS, 0,1%, sodium acetate

0,3M pH 5,0 pendant une heure à température ambiante. L'ARN est ensuite récupéré par précipitation dans l'éthanol en présence d'ARNt utilisé pour faciliter la précipitation. Le culot d'ARN est ensuite repris dans 10µl d'eau et soumis à une transcription inverse en présence de la reverse transcriptase «Stratascript» de l'oligonucléotide T7 (Stratagene).

- 5 Les fragments d'ADN simple brin sont ensuite amplifiés par PCR au moyen de l'oligonucléotide T7 (SEQ ID 14), de l'oligonucléotide SP6 (SEQ ID 14) et de la séquence SEQ ID 16 correspondant à la région linker adjacente à SP6.

- SEQ ID 16 : TATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCAT
CCAACGCGTTG

- 10 Une PCR de contrôle est conduite parallèlement avec les oligonucléotides SP6 et T7 afin de confirmer l'absence d'ADN-matrice contaminant, parmi les ARN sélectionnés. Les fragments amplifiés par PCR sont ensuite purifiés puis utilisés comme matrice de transcription dans le cycle suivant. Le cycle de sélection / amplification est répété 5 fois. Les produits de RT-PCR sont analysés sur gel d'agarose 2 % (figure 5 : Φx sont des
15 markers ADN (stratagène), 1 et 2 sont des produits d'amplification obtenus avec les amorces SP6 ou SEQ ID16. La concentration d'ARN lors des cycles ultérieurs est égale à 0,058 µM et celle de la protéine est diminuée régulièrement d'une valeur de 1,2 µM lors du second cycle à une valeur de 0,2 µM au cinquième cycle. Les produits de RT-PCR obtenus après les quatrième et cinquième cycles sont clonés dans un plasmide pTrcHis2-
20 TOPO (Invitrogen) choisi pour faciliter le procédé de clonage en l'absence du promoteur T7. Les plasmides ont été purifiés et séquencés. Les séquences obtenues ont été alignées à l'aide de logiciel Clustal W DNA (Thompson , J.D.et al CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. (1994) Nucleic
25 Acids Research, 22, 4673-4680) disponible sur le site du Pôle Bio-Informatique Lyonnais.

2/ Résultats

- 30 Comme illustré figure 6A, parmi 16 séquences d'ARN sélectionnés, clonés au bout de 4 et 5 cycles et séquencés à l'aide de la T7 amorce, 11 clones contiennent la séquence UACUGUCUUCACGCAGAAAGCGUCUAGCAUGGCGUU correspondant aux nucléotides 56 à 92 de la séquence SEQ ID1, 2 clones contiennent la séquence CGCCTCATGCCTGGAGAT (nt 61-72 de SEQ ID1) et un clone montre une homologie
35 avec la partie 84-90 de SEQ ID1. Ainsi, ces résultats identifient la région de l'IRES 56-92

de séquence TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTT (SEQ ID3) comme correspondant au site de fixation de MRR p116 (figure 6B).

L'hypothèse de l'inhibition compétitive offre un moyen supplémentaire d'étude de la spécificité de l'interaction en question. Comme il est indiqué sur la figure 7A, les séquences consensus des clones 4-35 (DOR 4-35) et 5-4 (DOR 5-4) sont les inhibiteurs les plus efficaces (après l'IRES lui-même) de l'interaction IRES-MRR de p116. Ces résultats confirment que la séquence consensus identifiée est un déterminant de la fixation de MRR p116 sur l'IRES entier.

De plus, les résultats des études d'affinité de MRRp116 pour les différents fragments de l'IRES (Figure 7B) par « filter-binding assay » montrent que le fragment consensus nt 56-92 est suffisant pour permettre la fixation de MRRp116. Au contraire, la région 73-92 correspondant à la boucle apicale de la région II (IIb) n'est pas suffisante pour la fixation de ce polypeptide.

Exemple 3 : Test de criblage in-vitro

L'intérêt de la présente découverte est de chercher à inhiber la fixation du MRR de p116 sur la séquence consensus SEQ ID 3 de la région II de l'IRES pour empêcher l'initiation de la traduction et par conséquent la synthèse protéique par le VHC.

Parmi les molécules potentielles, le Demandeur a sélectionné les aminoglycosides. Les aminoglycosides représentent une classe de molécules chimiques interagissant spécifiquement avec certaines molécules d'ARN repliées, telles que l'ARN ribosomale 16S, les ribozymes, et la région TAR du VIH. Cependant, la spécificité de ces molécules vis à vis de l'ARN du VHC ainsi que leur capacité à inhiber la traduction IRES-dépendante de l'IRES du VHC n'a pas été démontré auparavant.

Le test de criblage est effectué comme suit. On incube le MRR de p116 et la séquence consensus de la région II en présence de différents aminoglycosides. Le mélange d'ARN est ensuite déposé sur une membrane de nitrocellulose dans les mêmes conditions que dans l'exemple 2.

Les résultats sont représentés sur la figure 8. Parmi les 15 aminoglycosides testés à 4 concentrations différentes, les composés tobramycine et streptomycine inhibent la formation du complexe ARN-protéine à toutes les concentrations testées. Le tobramycine inhibe 43% du complexe MRRp116/II à concentration 20 μ M et 54% à 40 μ M. La streptomycine, quant à elle, inhibe 25% du complexe MRRp116/II à concentration 20 μ M et 36% à 40 μ M. En revanche, la néomycine et la sisomycine n'inhibent le complexe qu'à des concentrations supérieures à 40 μ M.

Les aminoglycosides kanamycine A, kanamycine B et tobramycine sont des molécules de structure très proche. Cependant, la tobramycine (43% d'inhibition à 20 μ M) est plus active que la kanamycine B (22% d'inhibition à 20 μ M) qui est à son tour plus active que la kanamycine A (0% d'inhibition à 20, 40 et 80 μ M). Ceci indique que la présence d'un aminogroupe en position R2 (tobramycine et kanamycine B) favorise la dissociation du complexe, alors que la présence du groupe hydroxyle en position R1 y est défavorable (kanamycine A). Par contre, le groupe amino en position 6' n'est pas directement impliqué dans l'interaction et peut donc être utilisé pour introduire des modifications permettant de diminuer les concentrations actives nécessaires.

Exemple 4 : Inhibition de la traduction cap-indépendante ex vivo

Dans cet exemple, on établit une corrélation entre les résultats obtenus dans le système de criblage *in vitro* (exemple 2) et ceux d'un système cellulaire bicistronique. Ceci permet de vérifier que l'inhibition de la formation du complexe protéine p116 eIF3 / ARN de l'IRES du VHC par une molécule chimique entraîne également une inhibition de la traduction dépendante de l'IRES dans des cellules *ex vivo*. Par ailleurs, ce test permet de déceler une éventuelle toxicité de la molécule en question pour la cellule elle-même, tout en mesurant son effet sur la traduction cap-dépendante.

a/ Préparation de vecteurs bicistroniques

Des construits bicistroniques constitués d'un premier cistron correspondant au gène de la luciférase Renilla, suivi de la séquence IRES, suivi d'un second cistron correspondant au gène de la luciférase Firefly (pRLuc-IRES-Fluc) sont préparés de la façon suivante. Un plasmide pRL-SV40 (Promega) est linéarisé avec Xba I et déphosphorylé. Parallèlement, l'IRES est amplifié avec le gène de la luciférase Firefly par PCR, en présence

d'oligonucléotides complémentaires contenant les sites XbaI. Les produits de PCR sont ensuite sous-clonés dans le plasmide pTrcHis2-TOPO (Invitrogen) afin de contrôler la digestion. La ligation de l'insert contenant l'IRES avec le gène de la luciférase Firefly et le vecteur pRL-SV40 linéarisé est effectuée à l'aide de T4 DNA ligase (Biolabs).

5

b/ Transfection de cellule HeLa

10⁷ cellules HeLa suspendues dans du DMEM exempt de sérum sont transfectées par 1 à 2,5 ug de plasmide pRLuc-IRES-Fluc par électroporation à 0,5 V pendant 30 millisecondes au moyen d'un Gene Pulser (BioRad). Les cellules sont ensuite cultivées dans des plaques 24 ou 96 puits en présence de différents aminoglycosides, à des concentrations comprises entre 2 et 5 mM pendant 24-36hs. L'activité de luciférase Renilla (traduction cap-dépendante) et celle de la luciférase Firefly (traduction cap-indépendante=virale) dans les lysats cellulaires est mesurée et comparée au moyen du test Dual-luciférase (Promega) et de luminomètre Lumat LB9507 (Berthold).

15

c/ Résultats

L'effet de 10 différents aminoglycosides sur la traduction dépendante de l'IRES et sur la traduction cap-dépendante est étudié à l'aide de cellules HeLa transfectées par la construction bicistronique (Figure 9A).

20

D'après les résultats apparaissant sur la figure 9B, parmi les 9 aminoglycosides testées, à concentration 1mM, la tobramycine inhibe la synthèse de la luciférase *Firefly* contrôlée par l'IRES du virus de l'hépatite C à 90,4%, alors que la synthèse de la luciférase *Renilla*, contrôlée par « cap », n'est pas inhibée (168% du contrôle). Un effet similaire est observé à une concentration de tobramycine de 2mM (la synthèse de IRES-luciférase est inhibée à 83% et celle de cap-luciférase est inhibée seulement à 27%).

25

L'hygromycine et G418 inhibent à la fois la traduction cap-dépendante et IRES-dépendante d'un façon IRES-nonspécifique.

30

L'effet de la paromomycine aux concentrations 1, 2 et 5 mM est plus prononcé sur la traduction IRES-dépendante (inhibée à 37%) que sur la traduction cap-dépendante (inhibée à 6,3%) et est donc modérément IRES-spécifique.

Lorsque l'on augmente la quantité d'ARN produite dans les cellules, en utilisant une plus forte concentration d'ADN plasmidique (Figure 9C), l'effet de tobramycine est moins prononcé (inhibition de la traduction IRES-dépendante de 36,5% à 2mM et de 69% à 5mM), avec une synthèse cap-dépendante non-inhibée (268 et 134% de contrôle).

5

Dans les mêmes conditions, la streptomycine inhibe la traduction des deux cistrons d'une façon IRES-non spécifique (à partir de 5mM en concentration). Ainsi, certains aminoglycosides sont capables d'inhiber la traduction dépendante de l'IRES d'un façon IRES-spécifique, sans inhiber la traduction de la cellule-hôte. Ces molécules non toxiques pour la cellule aux concentrations indiquées peuvent être utilisés pour traiter l'hépatite C.

10

Les résultats obtenus avec le système bicistronique sont cohérents avec ceux du test de criblage développé par le Demandeur (MRRp116/ domaine II) : la même molécule, la tobramycine, a été identifiée comme la plus active dans les deux systèmes. Ceci montre la pertinence du test de criblage revendiqué, qui peut être utilisé pour identifier de nouveaux inhibiteurs de la fixation de eIF3 sur l'IRES et de la traduction IRES-dépendante.

15

BIBLIOGRAPHIE

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. (1989)
5 Science 244:359-62 "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome."
2. Sizova DV, Kolupaeva VG, Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU (1998) J Virol 72:4775-82, Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs.
- 10 3. Kieft J., Zhou K., Jubin R., Doudna J., RNA (2001), 7:194-206, Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA
4. Buratti E, Tisminetzky S, Zotti M, Baralle FE (1998) Nucleic Acids Res 26:3179-87 Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3.
- 15 5. Zhao WD, Wimmer E. (2001) J Virol 75:3719-30 Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus chimera: new structure for domain II of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus.
6. Block KL, Vornlocher HP, Hershey JW. Characterization of cDNAs encoding the p44 and p35 subunits of human translation initiation factor eIF3.
20 (1998) J Biol Chem. 273:31901-8.
7. Asano K, Vornlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG, Hershey JW. (1997) Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly. J Biol Chem. 272:27042-52.
- 25 8. Stelz U, Spahn C, Nierhaus KH, (2000) Proc Natl Acad Scie USA 97, 4597-4602 «Selecting rRNA binding sites for the ribosomal proteins L4 et L6 from randomly fragmented rRNA application of method called SERF»

REVENDICATIONS

1/ Procédé de criblage de molécules selon lequel, in vitro :

- 5 a/ on incube ensemble la sous unité p116 (SEQ ID4) de la protéine eIF3, la
séquence nucléotidique de la région II (SEQ ID2) de l'IRES de VHC ou toute
séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ
ID 2) de l'IRES de VHC et la molécule à tester,
- 10 b/ on détecte ensuite la formation éventuelle de complexe p116 / région II IRES,
l'absence de complexe témoignant de la capacité inhibitrice de la molécule
testée, à inhiber la formation desdits complexes,
- c/ on sélectionne les molécules inhibant la formation des complexes.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que seule la séquence du motif de
15 reconnaissance de la protéine p116 (SEQ ID5) est incubée.

3/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que seule une partie de la région II
est incubée et correspond à la séquence nucléotidique consensus SEQ ID3 ou une
séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3.

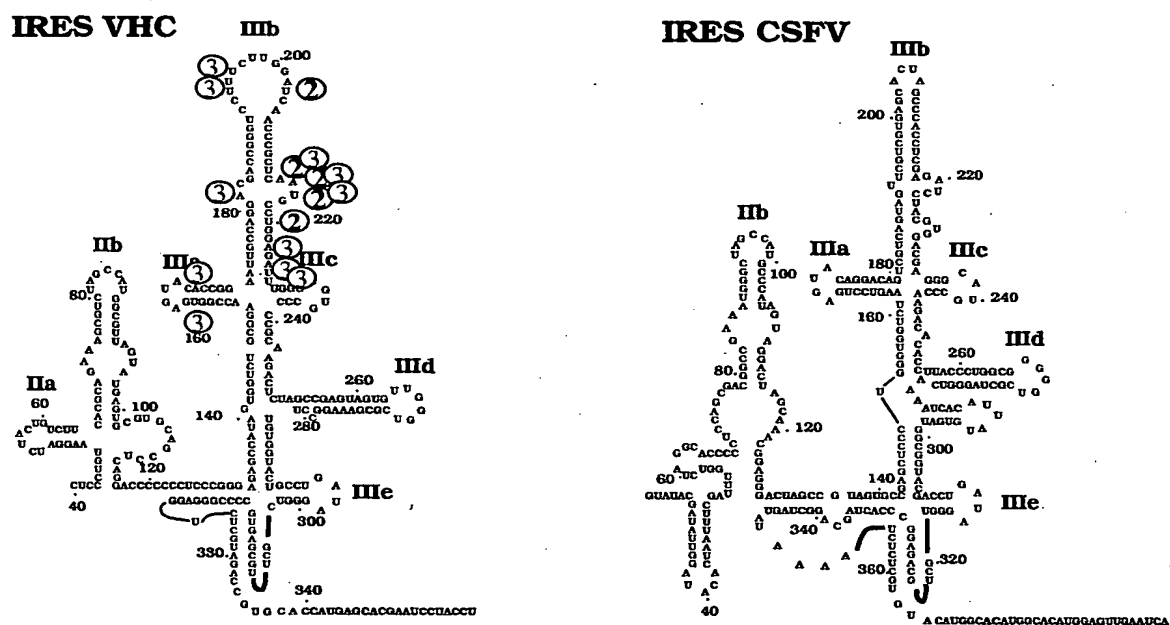
20 4/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la molécule à tester est incubée
à des doses croissantes.

5/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la détection est effectuée par
25 filtration du mélange au travers d'une membrane de nitrocellulose, puis par mesure de la
radioactivité liée à la membrane correspondant à la quantité d'ARN fixée sur la
membrane.

6/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on teste ensuite, ex vivo,
30 l'influence de la molécule sélectionnée en c) sur la traduction cap-indépendante et la
traduction cap-dépendante pour ne retenir que les molécules inhibant la traduction
cap-indépendante sans influencer la traduction cap-dépendante.

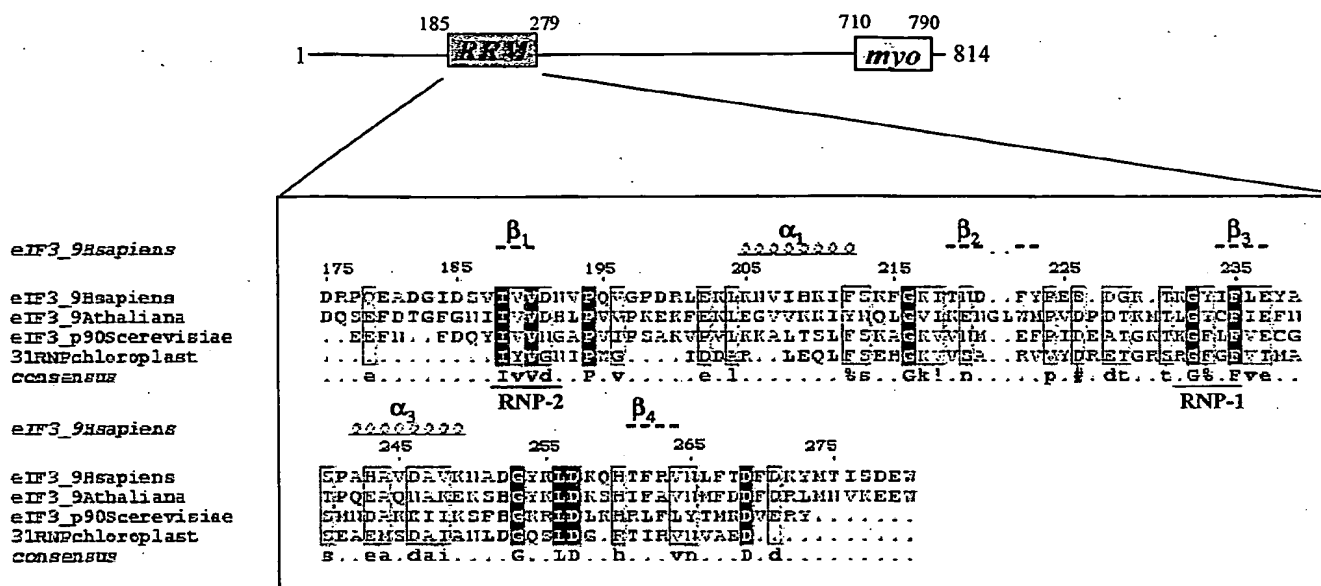
- 7/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on construit des vecteurs bicistroniques constitués de deux luciférase encadrant la séquence de la région II (SEQ ID 2) ou toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2), ou la séquence consensus (SEQ ID 3) ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3; la première luciférase étant traduite de manière cap-dépendante et la seconde de manière cap-indépendante ou inversement.
- 8/ Utilisation des molécules sélectionnées à l'issue du procédé de criblage objet de l'une des revendications 1 à 7 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).
- 9/ Utilisation d'un aminoglycoside pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).
- 10/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'aminoglycoside est la tobramycine.
- 11/ Composition pharmaceutique comprenant un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou de toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3, à l'exception de l'oligonucléotide de séquence TAGACGCTTTCTGCGTGAAGACAGTAGT.
- 12/ Utilisation d'un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou de toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3, à l'exception de l'oligonucléotide de séquence TAGACGCTTTCTGCGTGAAGACAGTAGT, comme médicament, pour le traitement de l'hépatite C (VHC) (délétion).

1/11

**FIGURE 1**

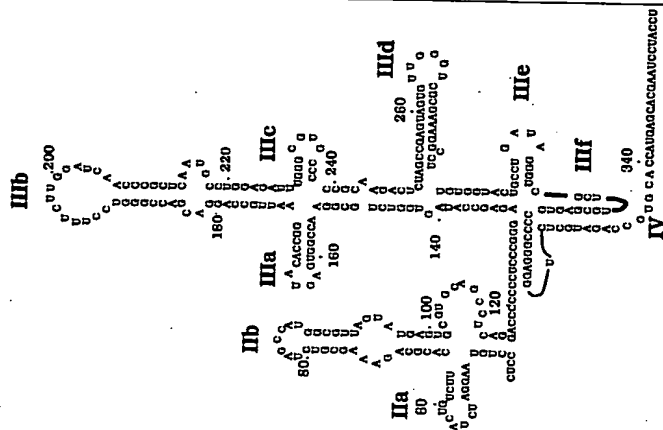
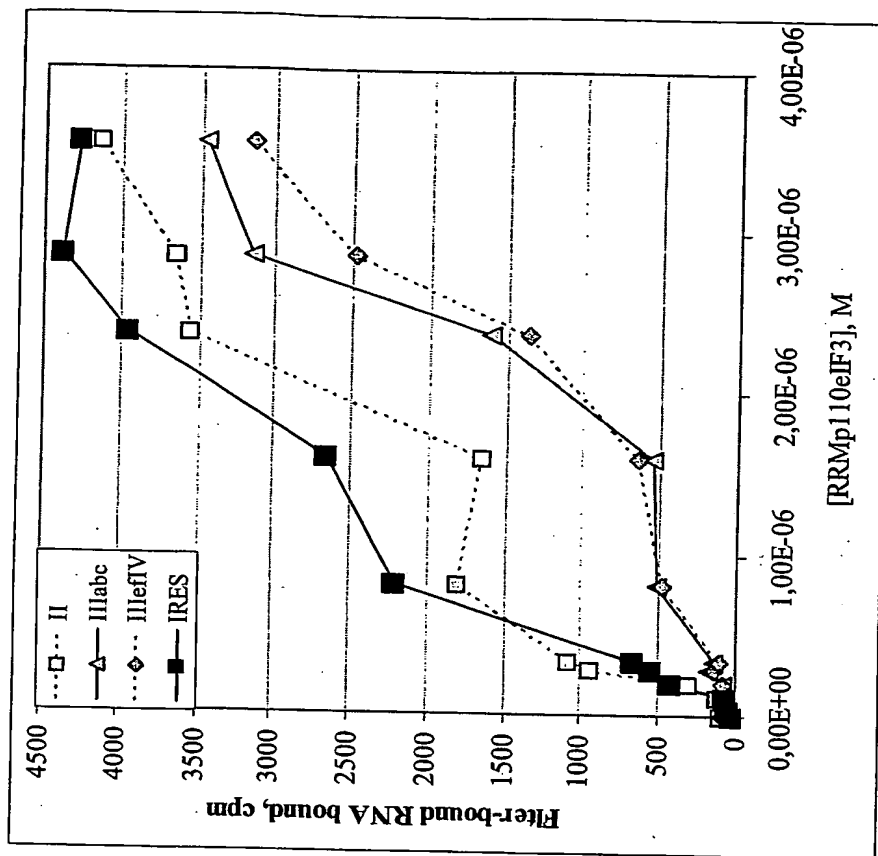
This Page Blank (uspto)

2/11

**FIGURE 2**

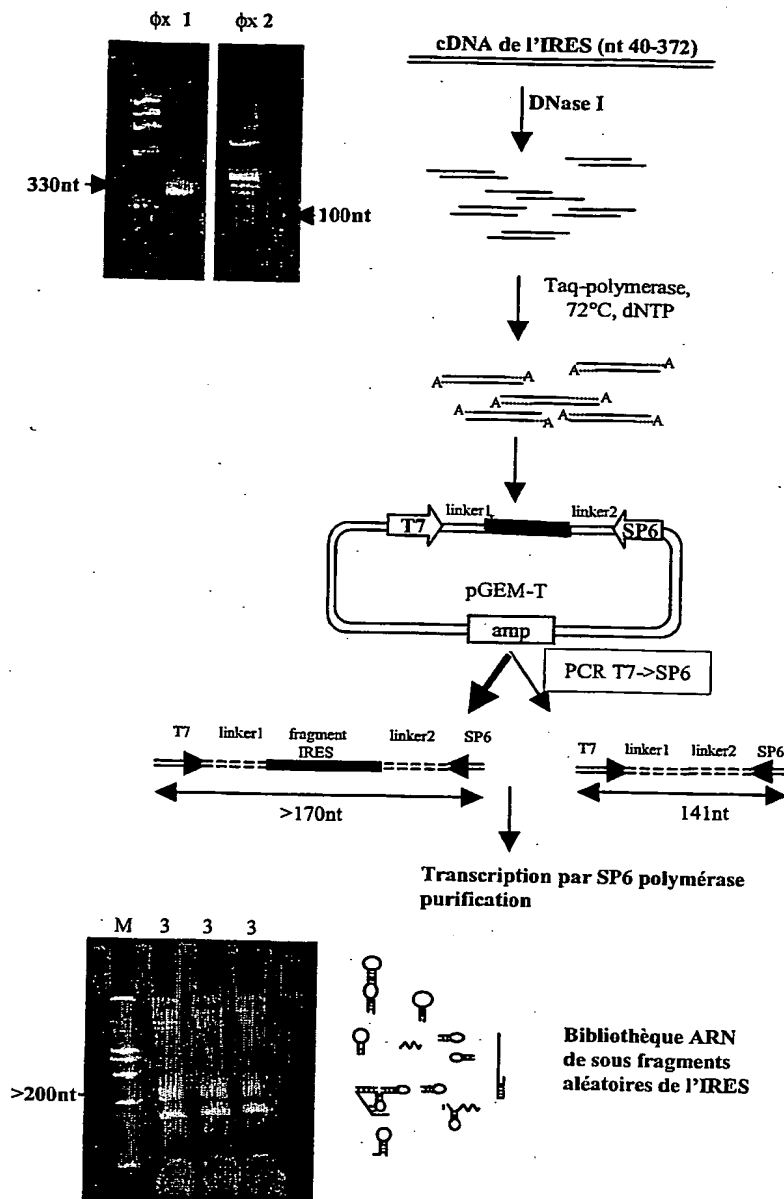
This Page Blank (uspto)

FIGURE 3



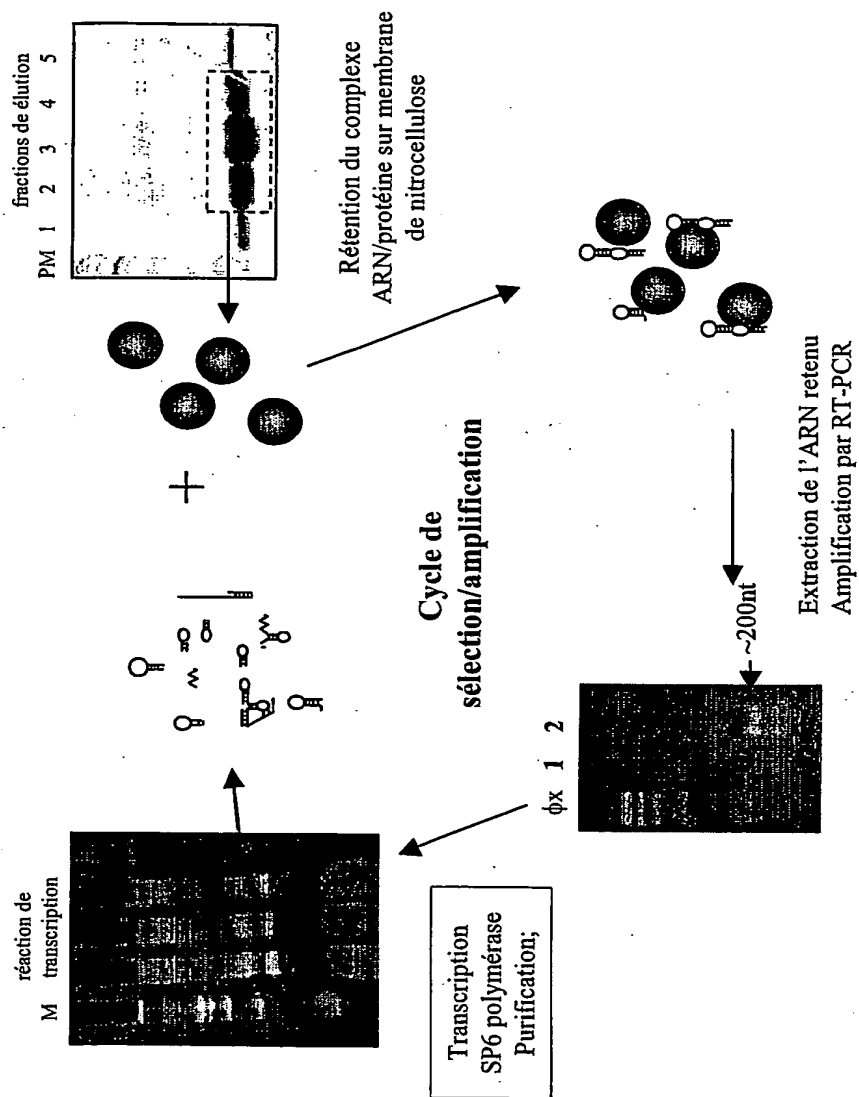
This Page Blank (uspto)

4/11

**FIGURE 4**

This Page Blank (uspto)

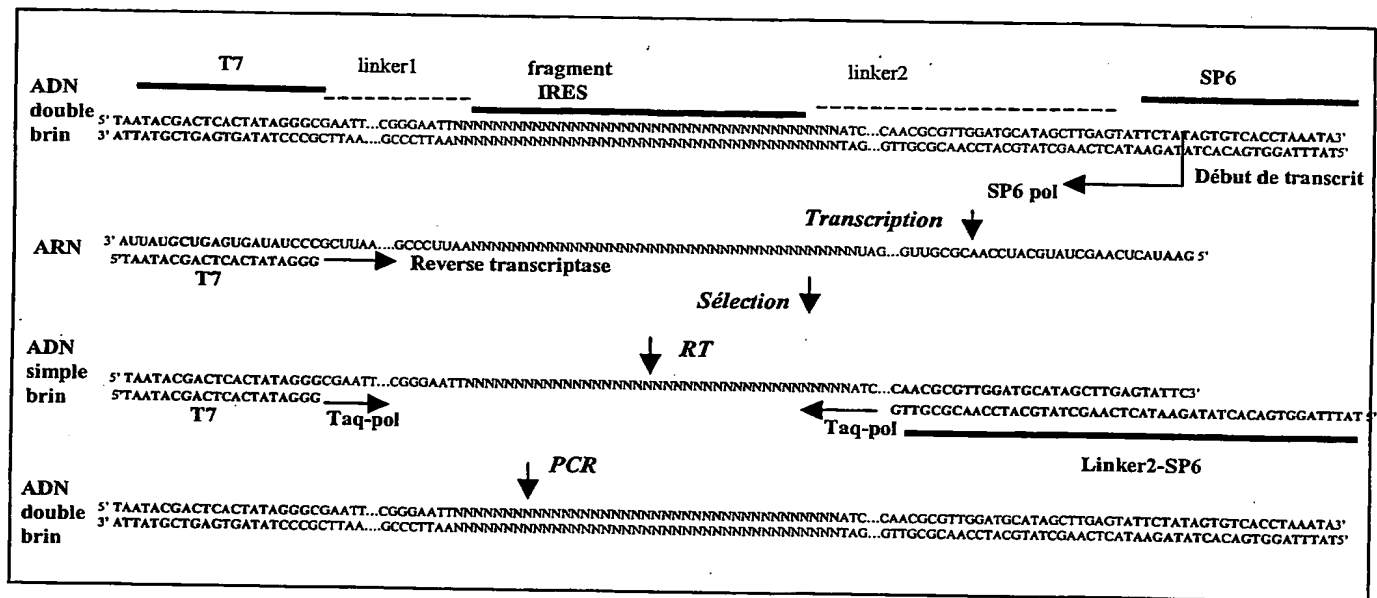
5/11

**FIGURE 5A**

This Page Blank (uspto)

6/11

FIGURE 5B



This Page Blank (uspto)

7/11

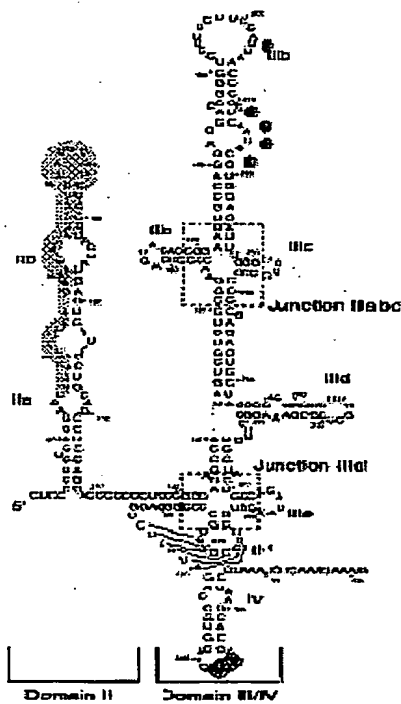
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|----------|-------------|------------------|----------------|---------------|-------------|--------|
| 1_10xx0 | | TACCGCTAGCC | TCCCCTCTGAGGA | CTACTGT | CTTCAC | GCA |
| 4_28xx1 | ----- | TACCGCTAGCC | TCCCCTCTGAGGA | CTACTGT | CTTCAC | GCA |
| 4_35xx2 | ----- | | | TACTGT | CTTCAC | GCA |
| 4_45xx3 | ----- | | C | TCCCCTCTGAGGA | CTACTGT | CTTCAC |
| 4_46xx4 | ----- | | | | TACTGC | CTTCAC |
| 5_2xx5 | ----- | | | CCTGTGAGGA | CTACTGT | CTTCAC |
| 5_4xx6 | ----- | | | GA | CTACTGT | CTTCAC |
| 5_6xx7 | ----- | TACCGCTAGCC | TCCCCTCTGAGGA | CTACTGT | CTTCAC | GCA |
| 5_10xx8 | ----- | TACCGCTAGCC | TCCCCTCTGAGGA | CTACTGT | CTTCAC | GCA |
| 5_12xx9 | ----- | | | A | TACCAAGCGCC | ATGGCT |
| 5_14xx10 | ----- | | | | TACTGT | CTTCAC |
| 5_16xx11 | ----- | | | | TACTGT | CTT |
| HCV IRES | TTGGGGGCGAC | ACTCCACCATAGATCA | CTCCCCTCTGAGGA | CTACTGT | CTTCAC | GCA |
| | | | | *** | * | ** |

| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
|----------|--------------------------|-------------------|---------------|-----|-----|-----|
| 4_10xx0 | GAAAGCGT-CTAGCCATGGCGTT | AGTATGAGTGTCTGGCC | | | | |
| 4_28xx1 | GAAAGCGT-CTAGCCATGGCGTT | AGTATGAGTGTCTGGCC | | | | |
| 4_35xx2 | GAAAGCGT-CTAGCCATGGCGTTA | GTACGAGTGTCTGGCA | | | | |
| 4_45xx3 | GAAAGCGT-CTAGCCATGGCGTT | AGTATGAGT | | | | |
| 4_46xx4 | GAAAGCGT-CTAGCCATGGCGTT | AGTA | | | | |
| 5_2xx5 | GAA-GCGT-CTAGCCATGGCG | | | | | |
| 5_4xx6 | GAAAGCGT-CTAGCCATGGCGTT | AG | | | | |
| 5_6xx7 | GAAAGCGTCTAGCCATGGCGCGG | GAGCATGCGACG | | | | |
| 5_10xx8 | GAAAGCGT-CTAGCCATGGCGTT | AGTATGAG | | | | |
| 5_12xx9 | AGACGCTTTCT | GCGTGAAGAC | AGTA | | | |
| 5_14xx10 | GAA-GCGT-CTAGCCATGGCGTT | AGTA | | | | |
| 5_16xx11 | GAA-GCGT-CT-GCCATGGCGTT | GTATCAAT | | | | |
| HCV IRES | GAAAGCGT-CTAGCCATGGCGTT | AGTATGAGTGTCTGGCA | GCTCCAGGACGCG | | | |
| | * * * * * | * * * | | | | |

FIGURE 6A

This Page Blank (uspto)

8/11

**FIGURE 6B**

This Page Blank (uspto)

9/11

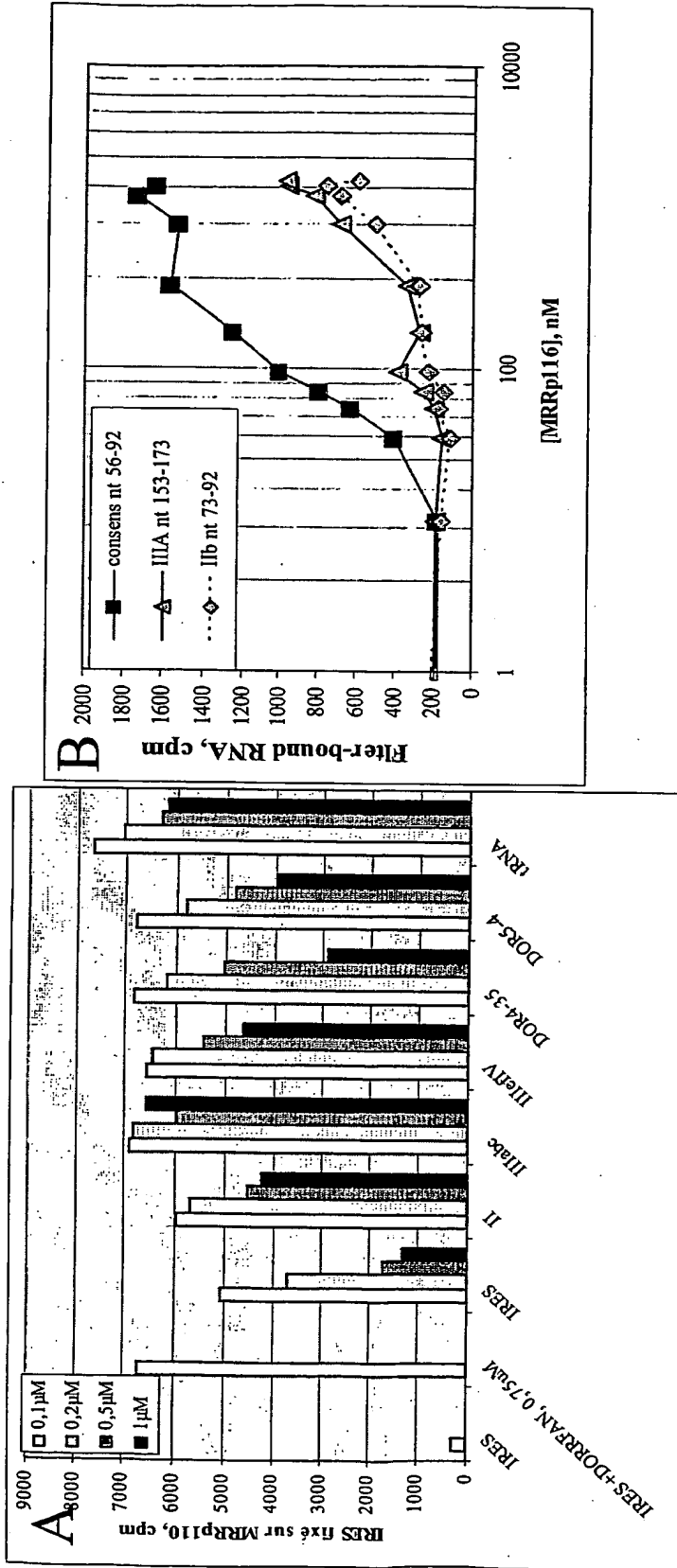
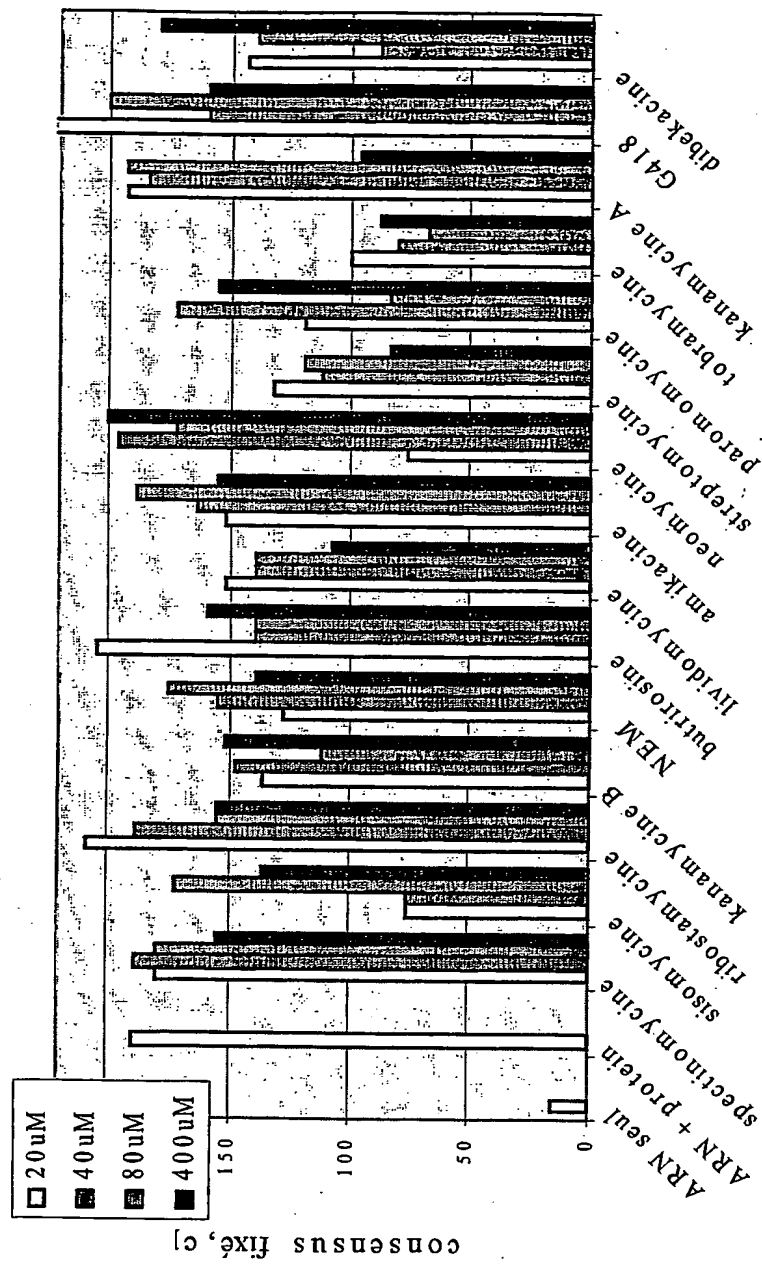


FIGURE 7

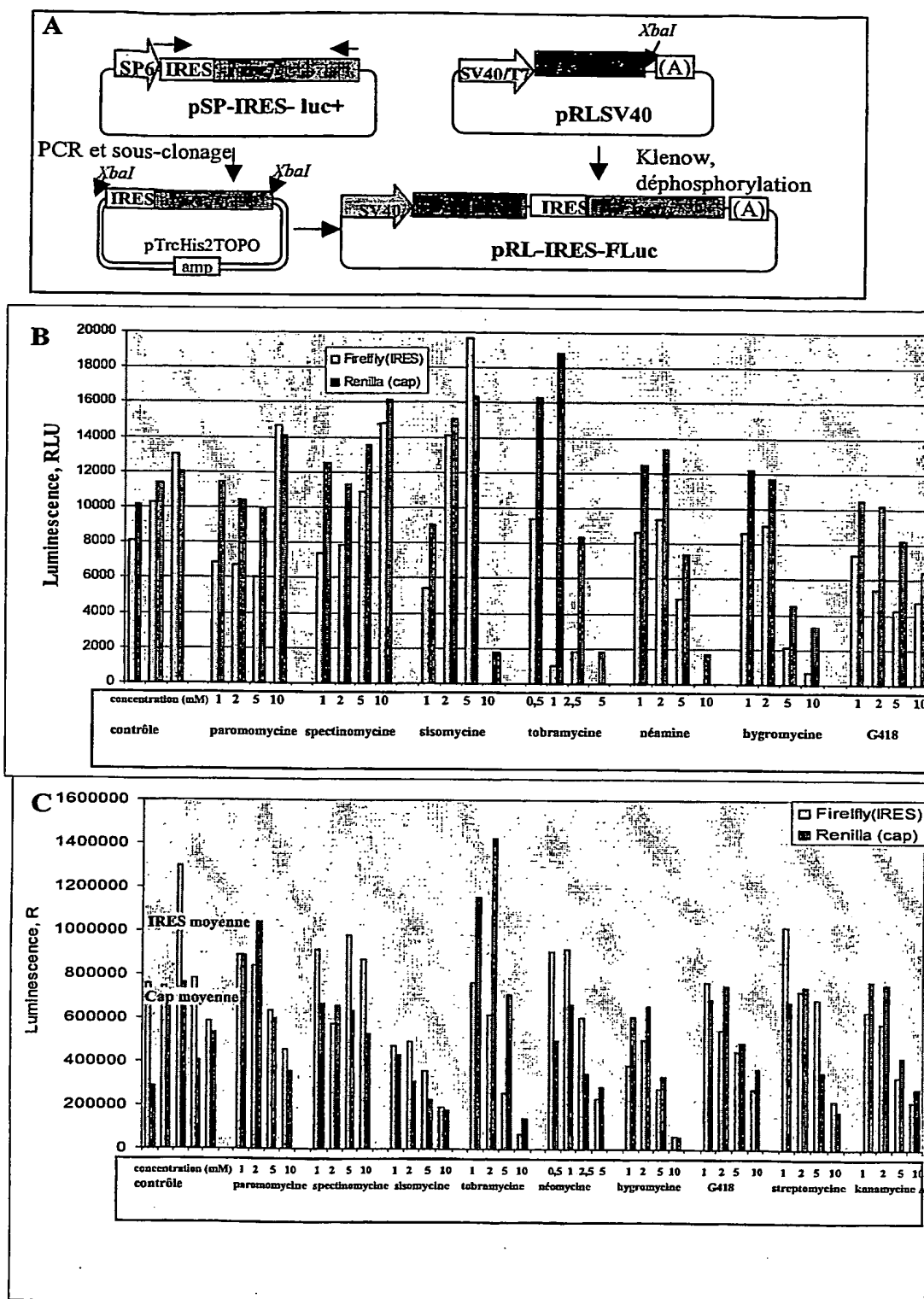
This Page Blank (uspto)

10/11

**FIGURE 8**

This Page Blank (uspto)

11/11

**FIGURE 9**

This Page Blank (uspto)

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

<120> MOLECULES INHIBITRICES DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE C ET PROCÉDE DE CRIBLAGE DESDITES MOLECULES INHIBITRICES

<130> U19-B-19536

<150> FR0215718

<151> 2002-12-12

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 326

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IRES du VHC

<400> 1

ctccctgtg aagaactact gtcttcacgc agaaagcgtc tagccatggc gttagtatga 60

gtgtcgtgca gcctccagga cccccctcc cgaggagagcc atagtggctc gcggaaccgg 120

tgagtacacc ggaattgcca ggatgaccgg gtcctttctt ggatcaaccc gctcaatgcc 180

tggagatttg ggcgtgcccc cgcgagactg ctagccgagt agtggtgggt cgcgaaaggc 240

cttgtggtac tgcctgatag ggtgcttgcg agtgccccgg gaggtctcgt agaccgtgca 300

tcatgagcac aaatcctaaa gaaaaa 326

<210> 2

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Région II de IRES de VHC

<400> 2

ctccctgtg aggaactact gtcttcacgc agaaagcgtc tagccatggc gttagtatga 60

gtgttggtgca gcctccagga 80

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Séquence consensus

<400> 3

tactgtcttc acgcagaaag cgtctagcca tggcggtt

37

<210> 4

<211> 814

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sous unité p110 de eIF3

<400> 4

Met Gln Asp Ala Glu Asn Val Ala Val Pro Glu Ala Ala Glu Glu Arg
1 5 10 15

Ala Glu Pro Gly Gln Gln Gln Pro Ala Ala Glu Pro Pro Pro Ala Glu
20 25 30

Gly Leu Leu Arg Pro Ala Gly Pro Gly Ala Pro Glu Ala Ala Gly Thr
35 40 45

Glu Ala Ser Ser Glu Glu Val Gly Ile Ala Glu Ala Gly Pro Glu Pro
50 55 60

Glu Val Arg Thr Glu Pro Ala Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ser Gly Pro
65 70 75 80

Ser Glu Ser Pro Ser Pro Pro Ala Ala Glu Glu Leu Pro Gly Ser His
85 90 95

Ala Glu Pro Pro Val Pro Ala Gln Gly Glu Ala Pro Gly Glu Gln Ala
100 105 110

Arg Asp Glu Arg Ser Asp Ser Arg Ala Gln Ala Val Ser Glu Asp Ala
115 120 125

Gly Gly Asn Glu Gly Arg Ala Ala Glu Ala Glu Pro Arg Ala Leu Glu
130 135 140

Asn Gly Asp Ala Asp Glu Pro Ser Phe Ser Asp Pro Glu Asp Phe Val
145 150 155 160

Asp Asp Val Ser Glu Glu Glu Leu Leu Gly Asp Val Leu Lys Asp Arg
165 170 175

Pro Gln Glu Ala Asp Gly Ile Asp Ser Val Ile Val Val Asp Asn Val
180 185 190

Pro Gln Val Gly Pro Asp Arg Leu Glu Lys Leu Lys Asn Val Ile His
195 200 205

Lys Ile Phe Ser Lys Phe Gly Lys Ile Thr Asn Asp Phe Tyr Pro Glu
210 215 220

Glu Asp Gly Lys Thr Lys Gly Tyr Ile Phe Leu Glu Tyr Ala Ser Pro
225 230 235 240

Ala His Ala Val Asp Ala Val Lys Asn Ala Asp Gly Tyr Lys Leu Asp
245 250 255

Lys Gln His Thr Phe Arg Val Asn Leu Phe Thr Asp Phe Asp Lys Tyr
260 265 270

Met Thr Ile Ser Asp Glu Trp Asp Ile Pro Glu Lys Gln Pro Phe Lys
275 280 285

Asp Leu Gly Asn Leu Arg Tyr Trp Leu Glu Glu Ala Glu Cys Arg Asp
290 295 300

Gln Tyr Ser Val Ile Phe Glu Ser Gly Asp Arg Thr Ser Ile Phe Trp
305 310 315 320

Asn Asp Val Lys Asp Pro Val Ser Ile Glu Glu Arg Ala Arg Trp Thr
325 330 335

Glu Thr Tyr Val Arg Trp Ser Pro Lys Gly Thr Tyr Leu Ala Thr Phe
340 345 350

His Gln Arg Gly Ile Ala Leu Trp Gly Gly Glu Lys Phe Lys Gln Ile
355 360 365

Gln Arg Phe Ser His Gln Gly Val Gln Leu Ile Asp Phe Ser Pro Cys
370 375 380

Glu Arg Tyr Leu Val Thr Phe Ser Pro Leu Met Asp Thr Gln Asp Asp
385 390 395 400

Pro Gln Ala Ile Ile Ile Trp Asp Ile Leu Thr Gly His Lys Lys Arg
405 410 415

Gly Phe His Cys Glu Ser Ser Ala His Trp Pro Ile Phe Lys Trp Ser
420 425 430

His Asp Gly Lys Phe Phe Ala Arg Met Thr Leu Asp Thr Leu Ser Ile
435 440 445

Tyr Glu Thr Pro Ser Met Gly Leu Leu Asp Lys Lys Ser Leu Lys Ile
450 455 460

Ser Gly Ile Lys Asp Phe Ser Trp Ser Pro Gly Gly Asn Ile Ile Ala
465 470 475 480

Phe Trp Val Pro Glu Asp Lys Asp Ile Pro Ala Arg Val Thr Leu Met
485 490 495

Gln Leu Pro Thr Arg Gln Glu Ile Arg Val Arg Asn Leu Phe Asn Val
500 505 510

Val Asp Cys Lys Leu His Trp Gln Lys Asn Gly Asp Tyr Leu Cys Val
515 520 525

Lys Val Asp Arg Thr Pro Lys Gly Thr Gln Gly Val Val Thr Asn Phe
530 535 540

Glu Ile Phe Arg Met Arg Glu Lys Gln Val Pro Val Asp Val Val Glu
545 550 555 560

Met Lys Glu Thr Ile Ile Ala Phe Ala Trp Glu Pro Asn Gly Ser Lys
565 570 575

Phe Ala Val Leu His Gly Glu Ala Pro Arg Ile Ser Val Ser Phe Tyr
580 585 590

His Val Lys Asn Asn Gly Lys Ile Glu Leu Ile Lys Met Phe Asp Lys
595 600 605

Gln Gln Ala Asn Thr Ile Phe Trp Ser Pro Gln Gly Gln Phe Val Val
610 615 620

Leu Ala Gly Leu Arg Ser Met Asn Gly Ala Leu Ala Phe Val Asp Thr
625 630 635 640

Ser Asp Cys Thr Val Met Asn Ile Ala Glu His Tyr Met Ala Ser Asp
645 650 655

Val Glu Trp Asp Pro Thr Gly Arg Tyr Val Val Thr Ser Val Ser Trp
660 665 670

Trp Ser His Lys Val Asp Asn Ala Tyr Trp Leu Trp Thr Phe Gln Gly
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Lys Asn Asn Lys Asp Arg Phe Cys Gln Leu Leu Trp
690 695 700

Arg Pro Arg Pro Pro Thr Leu Leu Ser Gln Glu Gln Ile Lys Gln Ile
705 710 715 720

Lys Lys Asp Leu Lys Lys Tyr Ser Lys Ile Phe Glu Gln Lys Asp Arg
725 730 735

Leu Ser Gln Ser Lys Ala Ser Lys Glu Leu Val Glu Arg Arg Arg Thr
740 745 750

Met Met Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Arg Lys Met Ala Gln Glu Leu Tyr
755 760 765

Met Glu Gln Lys Asn Glu Arg Leu Glu Leu Arg Gly Gly Val Asp Thr
770 775 780

Asp Glu Leu Asp Ser Asn Val Asp Asp Trp Glu Glu Glu Thr Ile Glu
785 790 795 800

Phe Phe Val Thr Glu Glu Ile Ile Pro Leu Gly Asn Gln Glu
805 810

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> MRR de p110

<400> 5

Met Asp Arg Pro Gln Glu Ala Asp Gly Ile Asp Ser Val Ile Val Val
1 5 10 15

Asp Asn Val Pro Gln Val Gly Pro Asp Arg Leu Glu Lys Leu Lys Asn
20 25 30

Val Ile His Lys Ile Phe Ser Lys Phe Gly Lys Ile Thr Asn Asp Phe
35 40 45

Tyr Pro Glu Glu Asp Gly Lys Thr Lys Gly Tyr Ile Phe Leu Glu Tyr
50 55 60

Ala Ser Pro Ala His Ala Val Asp Ala Val Lys Asn Ala Asp Gly Tyr
65 70 75 80

Lys Leu Asp Lys Gln His Thr Phe Arg Val Asn Leu Phe Thr Asp Phe
85 90 95

Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Asp Glu Trp
100 105

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> MRRfwd

<400> 6

catatgggac ggccccagga agcagatgga atc 33

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> MRRrev

<400> 7

gtgctcgagc cactcgtcac tgatcgatcat ata 33

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> IRESfwd

<400> 8

accgctagcc tcccctgtga ggaactact

29

<210> 9
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> IRESrev

<400> 9

gaaagctttt ttctttgagg tttaggattt gtgctcatga tgcacg

46

<210> 10
<211> 95
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> IIIIabcfwd

<400> 10

taatacgact cactataggg tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag

60

gacgaccggg tccttttcttg gataaaccgg ctcaa

95

<210> 11
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> IIIIabcrev

<400> 11

tagcagtctc gcggggggcac gcccaaattct ccaggcattg agcggggtga tccaagaaag

60

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> T7

<400> 12

taatacgact cactataggg

20

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> IIIIabcrev

<400> 13

tagcagtctc gcggggggcac g

21

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SP6

<400> 14

tatttaggtg acactataga at

22

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linkerrev

<400> 15

gtcctggtgg ctgcaggaca ctcatac

27

<210> 16

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LinkerSP6

<400> 16

tatttaggtg acactataga atactcaagc tatgcatcca acgcgttg

48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

FR 03/03675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 G01N33/569 C12Q1/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO 01/44266 A (KARN JONATHAN ; RIBOTARGETS LTD (GB); WALKER STEPHEN (GB)) 21 June 2001 (2001-06-21) cited in the application | 1,3,4,6, 9 |
| Y | page 2, line 12 - page 4, line 22 page 1, line 5 - line 28 page 11, line 4 - line 29; claims 18-21 page 31, line 4 - page 33, line 8 | 5,7 |
| X | US 6 284 458 B1 (FURUKAWA SHINICHI ET AL) 4 September 2001 (2001-09-04) Le document en entier, en particulier SEQ ID NO: 33 | 11,12 |
| X | US 6 153 421 A (EMERSON SUZANNE U ET AL) 28 November 2000 (2000-11-28) SEQ ID 16 | 11 |
| | --- -/-- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 June 2004

Date of mailing of the international search report

09/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luzzatto, E

International Application No.

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

/FR 03/03675

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | <p>BURATTI E ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE INTERACTION BETWEEN HCV 5'UTR AND PUTATIVE SUBUNITS OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR ELF3" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 26, no. 13, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 3179-3187, XP000993424 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1 |

Continuation of Box I.2

Claim : 8

Claim 8 relates to the use of a molecule which is only defined in terms of the fact that it is selected as a result of the method of claim 1. However, this definition is not sufficient for a person skilled in the art to understand the scope of the claim. Said claim 8 therefore lacks clarity under CPI Article L.612-6. This lack of clarity is such that it is impossible to carry out a meaningful search directed to the subject matter of said claim. Consequently, the search has not been carried out with regard to this subject matter.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority, the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report or in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 03/03675

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0144266 | A | 21-06-2001 | AU 2201801 A | 25-06-2001 |
| | | | CA 2391814 A1 | 21-06-2001 |
| | | | EP 1237899 A2 | 11-09-2002 |
| | | | WO 0144266 A2 | 21-06-2001 |
| | | | US 2002127543 A1 | 12-09-2002 |
| US 6284458 | B1 | 04-09-2001 | JP 6296492 A | 25-10-1994 |
| | | | AT 202383 T | 15-07-2001 |
| | | | AU 680435 B2 | 31-07-1997 |
| | | | AU 4983793 A | 29-03-1994 |
| | | | CA 2143678 A1 | 17-03-1994 |
| | | | DE 69330372 D1 | 26-07-2001 |
| | | | DE 69330372 T2 | 14-03-2002 |
| | | | DK 662157 T3 | 27-08-2001 |
| | | | EP 0662157 A1 | 12-07-1995 |
| | | | WO 9405813 A1 | 17-03-1994 |
| | | | JP 8506479 T | 16-07-1996 |
| | | | NZ 255578 A | 26-11-1996 |
| | | | NZ 286209 A | 29-09-2000 |
| | | | US 2004033978 A1 | 19-02-2004 |
| US 6153421 | A | 28-11-2000 | AU 746965 B2 | 09-05-2002 |
| | | | AU 8488998 A | 10-02-1999 |
| | | | CA 2295552 A1 | 28-01-1999 |
| | | | EP 0998567 A2 | 10-05-2000 |
| | | | WO 9904008 A2 | 28-01-1999 |
| US 6001990 | A | 14-12-1999 | EP 0759979 A1 | 05-03-1997 |
| | | | JP 10503364 T | 31-03-1998 |
| | | | WO 9530746 A1 | 16-11-1995 |
| WO 9423041 | A | 13-10-1994 | AU 6497694 A | 24-10-1994 |
| | | | CA 2159639 A1 | 13-10-1994 |
| | | | EP 0693126 A1 | 24-01-1996 |
| | | | JP 8509213 T | 01-10-1996 |
| | | | WO 9423041 A2 | 13-10-1994 |
| | | | US 2002160976 A1 | 31-10-2002 |
| | | | US 2003144226 A1 | 31-07-2003 |
| | | | US 2002165194 A1 | 07-11-2002 |
| | | | US 2002160977 A1 | 31-10-2002 |
| | | | US 5738985 A | 14-04-1998 |
| | | | US 6156496 A | 05-12-2000 |
| FR 2815358 | A | 19-04-2002 | FR 2815358 A1 | 19-04-2002 |
| | | | AU 1065302 A | 29-04-2002 |
| | | | WO 0233376 A2 | 25-04-2002 |

This Page Blank (uspto)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

/FR 03/03675

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/68 G01N33/569 C12Q1/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| X | WO 01/44266 A (KARN JONATHAN ; RIBOTARGETS LTD (GB); WALKER STEPHEN (GB)) 21 juin 2001 (2001-06-21) cité dans la demande | 1, 3, 4, 6, 9 |
| Y | page 2, ligne 12 - page 4, ligne 22 page 1, ligne 5 - ligne 28 page 11, ligne 4 - ligne 29; revendications 18-21 page 31, ligne 4 - page 33, ligne 8 | 5, 7 |
| X | US 6 284 458 B1 (FURUKAWA SHINICHI ET AL) 4 septembre 2001 (2001-09-04) Le document en entier, en particulier SEQ ID NO: 33 | 11, 12 |
| X | US 6 153 421 A (EMERSON SUZANNE U ET AL) 28 novembre 2000 (2000-11-28) SEQ ID 16 | 11 |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

*** Catégories spéciales de documents cités:**

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 juin 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/06/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Luzzatto, E

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| X | US 6 001 990 A (WAKITA TAKAJA ET AL) 14 décembre 1999 (1999-12-14) cité dans la demande * SEQ ID NO: 2 et 3 * revendications | 11,12 |
| Y | WO 94/23041 A (RIBOGENE INC) 13 octobre 1994 (1994-10-13) page 13, ligne 11 -page 14, ligne 12; revendications; figure 6 | 7 |
| Y | SIZOVA D V ET AL: "SPECIFIC INTERACTION OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 WITH THE 5' NONTRANSLATED REGIONS OF HEPATITIS C VIRUS AND CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS RNAS" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 72, no. 6, juin 1998 (1998-06), pages 4775-4782, XP000993423 ISSN: 0022-538X cité dans la demande le document en entier | 5 |
| A | CHEN P J ET AL: "Molecular biology of hepatitis D virus: research and potential for application." JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY. AUSTRALIA OCT 1997, vol. 12, no. 9-10, octobre 1997 (1997-10), pages S188-S192, XP009015926 ISSN: 0815-9319 le document en entier | 9,10 |
| A | FR 2 815 358 A (PARTEUROP DEV) 19 avril 2002 (2002-04-19) cité dans la demande le document en entier | |
| A | CASTROAGUDIN J F ET AL: "Streptococcus bovis bacteremia and endocarditis in patients with liver disease without evidence of colonic pathology." REVISTA ESPANOLA DE ENFERMEDADES DIGESTIVAS, vol. 88, no. 9, 1996, pages 605-608, XP009015917 ISSN: 1130-0108 abrégé | 9,10 |

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dep. de Internationale No

/FR 03/03675

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | <p>BURATTI E ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE INTERACTION BETWEEN HCV 5'UTR AND PUTATIVE SUBUNITS OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR ELF3" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 26, no. 13, 1 juillet 1998 (1998-07-01), pages 3179-3187, XP000993424 ISSN: 0305-1048 cité dans la demande le document en entier</p> | 1 |

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 8

La revendication 8 a trait à l'utilisation d'une molécule seulement définie en tant que sélectionnée à l'issue du procédé de la revendication 1. Toutefois cette définition ne suffit par pour que l'homme du métier puisse comprendre la portée de la revendication. Ladite revendication 8 manque donc de clarté au sens de l'Article L.612-6 CPI. Ce manque est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet de ladite revendication devient impossible. Par conséquent, la recherche n'a pas été effectuée pour l'objet de cette revendication.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n^{os} 8 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document de l'Organisation Mondiale de l'Intellectuelle No

FR 03/03675

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|----|------------------------|---|------------------------|
| WO 0144266 | A | 21-06-2001 | AU 2201801 A | 25-06-2001 |
| | | | CA 2391814 A1 | 21-06-2001 |
| | | | EP 1237899 A2 | 11-09-2002 |
| | | | WO 0144266 A2 | 21-06-2001 |
| | | | US 2002127543 A1 | 12-09-2002 |
| US 6284458 | B1 | 04-09-2001 | JP 6296492 A | 25-10-1994 |
| | | | AT 202383 T | 15-07-2001 |
| | | | AU 680435 B2 | 31-07-1997 |
| | | | AU 4983793 A | 29-03-1994 |
| | | | CA 2143678 A1 | 17-03-1994 |
| | | | DE 69330372 D1 | 26-07-2001 |
| | | | DE 69330372 T2 | 14-03-2002 |
| | | | DK 662157 T3 | 27-08-2001 |
| | | | EP 0662157 A1 | 12-07-1995 |
| | | | WO 9405813 A1 | 17-03-1994 |
| | | | JP 8506479 T | 16-07-1996 |
| | | | NZ 255578 A | 26-11-1996 |
| | | | NZ 286209 A | 29-09-2000 |
| | | | US 2004033978 A1 | 19-02-2004 |
| US 6153421 | A | 28-11-2000 | AU 746965 B2 | 09-05-2002 |
| | | | AU 8488998 A | 10-02-1999 |
| | | | CA 2295552 A1 | 28-01-1999 |
| | | | EP 0998567 A2 | 10-05-2000 |
| | | | WO 9904008 A2 | 28-01-1999 |
| US 6001990 | A | 14-12-1999 | EP 0759979 A1 | 05-03-1997 |
| | | | JP 10503364 T | 31-03-1998 |
| | | | WO 9530746 A1 | 16-11-1995 |
| WO 9423041 | A | 13-10-1994 | AU 6497694 A | 24-10-1994 |
| | | | CA 2159639 A1 | 13-10-1994 |
| | | | EP 0693126 A1 | 24-01-1996 |
| | | | JP 8509213 T | 01-10-1996 |
| | | | WO 9423041 A2 | 13-10-1994 |
| | | | US 2002160976 A1 | 31-10-2002 |
| | | | US 2003144226 A1 | 31-07-2003 |
| | | | US 2002165194 A1 | 07-11-2002 |
| | | | US 2002160977 A1 | 31-10-2002 |
| | | | US 5738985 A | 14-04-1998 |
| | | | US 6156496 A | 05-12-2000 |
| FR 2815358 | A | 19-04-2002 | FR 2815358 A1 | 19-04-2002 |
| | | | AU 1065302 A | 29-04-2002 |
| | | | WO 0233376 A2 | 25-04-2002 |